



João Pedro dos Santos Borges

Licenciado em Ciências da Engenharia Mecânica

**Desenvolvimento de Técnicas Baseadas
em Filmes de Células Bacterianas para
Aplicação em Ensaios Não Destrutivos
de Materiais de Engenharia**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Mecânica

Orientador: Doutor Telmo Jorge Gomes dos Santos, Professor
Auxiliar Convidado da Faculdade de Ciências e Tecnologia da
Universidade Nova de Lisboa

Co-orientador: Doutora Carla da Conceição Caramujo
Rocha de Carvalho, Investigadora Auxiliar do Instituto Superior
Técnico da Universidade Técnica de Lisboa

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Rosa Maria Mendes Miranda
Arguentes: Prof. Doutora Maria Teresa Freire Vieira
Vogais: Prof. Doutor Telmo Jorge Gomes dos Santos
Prof. Doutora Carla da Conceição Caramujo Rocha de Carvalho



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro de 2011

Desenvolvimento de Técnicas Baseadas em Filmes de Células Bacterianas para Aplicação em Ensaaios Não Destrutivos (END) de Materiais de Engenharia

Copyright © 2011 João Pedro dos Santos Borges

Faculdade Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa tem o direito, perpetuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua copia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer à minha família, nomeadamente aos meus pais por me terem permitido ter chegado onde cheguei a nível escolar, à minha irmã que me tem acompanhado sempre e aos meus sobrinhos que com a tenra idade que têm, são uma fonte contagiante de energia.

Ao meu orientador, o Professor Telmo Santos, agradeço a sua enorme disponibilidade e o entusiasmo sempre demonstrado ao longo deste trabalho. Agradecer também o partilhar de muitos conhecimentos e pela constante ajuda sempre que necessitei.

À minha co-orientadora, a Professora Carla Carvalho, agradeço também a sua enorme disponibilidade e o partilhar de novos conhecimentos, numa área totalmente nova, fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos técnicos das oficinas do DEMI da FCT, nomeadamente o Senhor António Campos e ao Senhor Paulo Magalhães, pelo enorme companheirismo e pelos ensinamentos partilhados no que a operações de maquinação e de polimento diz respeito.

Ao Professor Stanimir Valtcher, pelo disponibilizar de conhecimentos enriquecedores para o trabalho e pelo disponibilizar de equipamentos fundamentais para os ensaios realizados.

Quero agradecer aos meus amigos por tudo o que representaram para mim e por tudo o que me ajudaram não só neste trabalho mas também durante a minha formação superior.

Agradeço ao Departamento de Engenharia Mecânica e Industrial (DEMI) da Faculdade de Ciências e Tecnologia (FCT) e ao Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia (IBB) do Instituto Superior Técnico (IST), pelo disponibilizar das instalações e equipamentos necessários ao desenvolvimento deste trabalho.

Desejo ainda agradecer à empresa 2AB – Auto Acessórios da Benedita, Lda pela cedência de componentes para o equipamento de aplicação de campos eléctricos.

RESUMO

O aparecimento de novos materiais e tecnologias de produção, assim como a crescente implementação industrial da microfabricação, têm conduzido à necessidade de desenvolvimento de novas técnicas de Ensaio Não Destrutivo (END) capazes de se adaptarem a este novo paradigma de inspeção.

O objectivo deste trabalho foi desenvolver uma técnica inovadora de END, baseada em filmes de células bacterianas, pretendendo utilizar-se a dimensão microscópica, a aderência e as propriedades de mobilidade das células bacterianas, de forma a identificar, dimensionar e caracterizar os defeitos existentes nos materiais.

Foram desenvolvidas diferentes metodologias de inspecção envolvendo células bacterianas e materiais com diferentes propriedades. Foram concebidos e produzidos diversos componentes de equipamento laboratorial dedicado para a aplicação dessas metodologias. Foram criados defeitos padrão artificiais em diferentes materiais, e foi realizada a validação experimental das metodologias desenvolvidas.

Verificou-se que as células bacterianas aderem preferencialmente aos defeitos e que é possível identificar defeitos com cerca de 20 μm de dimensão, aplicando a metodologia de inspecção mais simples. Verificou-se também que é possível observar estes defeitos a olho nu, mediante uma etapa de revelação que consiste em promover o crescimento de colónias de bactérias em etanol.

Com os resultados experimentais alcançados é possível concluir que as metodologias propostas, embora requerendo desenvolvimentos adicionais, revelam elevado potencial enquanto técnicas de END para defeitos superficiais.

Palavras-chave:

Tecnologia Mecânica

Ensaio Não Destrutivo

Filmes de células bacterianas

Micro-defeitos

ABSTRACT

The emerging of new materials and manufacturing processes, as well as, the development of smaller and more compact parts, has driven the need to investigate and develop new and more capable non-destructive testing technologies that could adapt to a rapidly changing market.

The present work features the research and development of an innovative Non-Destructive Testing (NDT), based on the use of films of microscopic scale bacterial cells to identify, measure and characterize defects, given their adhesion properties and mobility. To do so, various defect matrices were produced in different materials, as well as, experimental devices for the subsequent application of electric and magnetic fields, according to several new inspection procedures. There are certain similarities between this new NDT technique and penetrant testing, since both methods present common stages.

After several tests, it was found that the selected process parameters for electric and magnetic field excitation failed to successfully drive the bacteria towards the defects. For the bacterial suspensions tested, the cells tended to concentrate near the defects, adhesion increasing with the increase of penetration time and cell hydrophobicity. The exception was observed on copper surfaces since they present anti-bacterial properties. By comparing suspensions containing cells with a positive or negative surface charge, it was found that positive bacteria suspension allowed a better identification of defects in aluminum, steel and PMMA surfaces, while the negatively charged bacteria were more successful on copper surfaces. The lower threshold of detectability (around 20.3 μm) occurred while using a positive bacteria suspension on steel.

When growth conditions were given to cells adherent to the defects, significant growth to allow the observance of colonies with the naked eye was only obtained with ethanol as carbon source.

Key-words:

Manufacturing Technology

Non Destructive Testing

Films of bacterial Cells

Micro-Defects

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	iii
RESUMO	v
Palavras-chave:.....	v
ABSTRACT	vii
Key- words:.....	vii
ÍNDICE.....	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiii
SIGLAS	xv
NOMENCLATURA	xvii
1. Introdução	1
1.1. Estado da Arte e Motivação	1
1.2. Objectivos	4
1.3. Impacto Industrial e Aplicação do Trabalho Desenvolvido	5
2. Revisão do Estado da Arte	7
2.1. Introdução	7
2.2. Ensaio Não Destrutivo	7
2.3. Ensaio Não Destrutivo por Líquidos Penetrantes (LP)	8
2.4. Microfabricação	11
2.5. Fundamentos Sobre Força Eléctrica, Campo Eléctrico, Condensadores de Placas Paralelas e Campo Magnético	13
2.6. Fundamentos Sobre Adesão e Biofilmes	17
2.7. Efeito Anti-Bacteriano do Cobre	20
2.8. Biocorrosão em Metais	21
2.9. Análise de Trabalho Similar Desenvolvido	23
3. Abordagem à Técnica Inovadora de END por Filmes de Células Bacterianas	25
3.1. Introdução	25
3.2. Aplicações	25
3.3. Metodologia de Teste.....	26
3.4. Paralelismo Entre Líquidos Penetrantes e Técnica a Desenvolver.....	33
4. Desenvolvimento e Produção de Defeitos Padrão	35
4.1. Introdução	35
4.2. Desenvolvimento das Matrizes de Defeitos Padrão	35
4.3. Produção dos Defeitos	38
5. Desenvolvimento de Meios Laboratoriais Para Aplicação das Metodologias de Teste	43
5.1. Introdução	43
5.2. Desenvolvimento e Produção de Componentes para Adaptação à Base do Microscópio	43
5.3. Desenvolvimento e Produção de Placas de Campo Eléctrico Capazes de Gerar um Campo Mais Homogéneo.....	45

5.4.	Desenvolvimento e Produção de Componentes Para a Fase de Remoção do Excesso da Etapa 5	
	46	
6.	Ensaaios Laboratoriais	49
6.1.	Introdução	49
6.2.	Primeiros Ensaaios Laboratoriais Efectuados	50
6.3.	Ensaaios Laboratoriais Utilizando um Gerador de Alta Tensão e as Placas de Campo Eléctrico	59
6.4.	Ensaaios Experimentais Sem a Utilização de Campos Eléctricos e Magnéticos	63
6.5.	Fase de revelação dos defeitos das amostras	79
6.5.1	Crescimento com a Fonte de Carbono Adequada ao Tipo de Carga da Suspensão Bacteriana Pretendido	79
6.5.2	Crescimento com Etanol como Fonte de Carbono	85
6.6.	Biocorrosão na Amostra de Aço	87
7.	Conclusões	89
8.	Propostas para desenvolvimentos futuros	93
	Referências Bibliográficas	95
	Anexos	i
	A1 – Folhas de desenho em SolidWorks para os principais componentes a adaptar ao microscópio	ii
	A2 - Folhas de desenho em SolidWorks para os principais componentes do sistema de placas de campo eléctrico capazes de gerar um campo mais homogéneo	ix
	A3 - Folhas de desenho em SolidWorks para os componentes do sistema produzido para a remoção do excesso de suspensão bacteriana à superfície	xv
	A4 – Imagens em tamanho grande para sobressair os defeitos que não eram visíveis na imagem pequena	xxi

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Exemplos de graves acidentes sucedidos: a) Quebra do casco do petroleiro Prestige [2], b) Demonstração das consequências ambientais do derrame de petróleo [3], c) Acidente de Ayrton Senna [4]	2
Figura 1.2 – Esquema representativo da relação actual entre filmes de células bacterianas e END	3
Figura 2.1 – Preparação e limpeza inicial da superfície [9].....	9
Figura 2.2 – Penetração do LP na fissura [9].....	10
Figura 2.3 – Remoção do excesso de LP da superfície [9].....	10
Figura 2.4 – Aplicação do revelador [9].....	10
Figura 2.5 – Absorção do LP pelo revelador [9].....	11
Figura 2.6 - Comparação de um micro-componente com uma formiga [11].....	12
Figura 2.7 – Efeito de atracção/repulsão nas cargas eléctricas [13]	13
Figura 2.8 – Campo eléctrico uniforme [14]	14
Figura 2.9 – Condensador de placas paralelas [15].....	15
Figura 2.10 – Ligação entre duas placas paralelas e uma bateria [16]	15
Figura 2.11 – Solenoide em que passa uma corrente i [17]	17
Figura 2.12 - Modelo de desenvolvimento de um biofilme bacteriano [30].....	20
Figura 3.1 – Micro-defeitos em pás de turbinas de avião [51].....	26
Figura 3.2 – Metodologia genérica de teste.....	27
Figura 3.3 – Principais etapas dos ensaios a efectuar.....	32
Figura 4.1 – Representação esquemática dos defeitos padrão da matriz alternada	36
Figura 4.2 – Representação esquemática dos defeitos padrão da matriz diagonal	36
Figura 4.3 – Representação esquemática dos defeitos padrão da matriz aleatória	37
Figura 4.4 – Representação esquemática dos defeitos padrão da matriz reduzida	37
Figura 4.5 – Pedacos de material a utilizar para a produção das amostras de: a) Alumínio, b) Aço, c) Cobre, d) PMMA	39
Figura 4.6 – Matriz diagonal produzida nos diversos tipos de materiais utilizados: a) Alumínio, b) Cobre, c) PMMA, d) Aço.....	40
Figura 4.7 – Matriz aleatória produzida nos diversos tipos de materiais utilizados: a)Alumínio, b) Cobre, c) PMMA, d) Aço.....	41
Figura 4.8 – Matriz alternada produzida nos diversos tipos de materiais utilizados: a) Alumínio, b) Cobre, c) PMMA, d) Aço.....	41
Figura 4.9 – Matriz reduzida produzida nos diversos tipos de materiais utilizados: a) Alumínio, b) Cobre, c) PMMA, d) Aço.....	42
Figura 4.10 – Matrizes de defeito: a) matriz diagonal, b) matriz aleatória	42
Figura 5.1 – Vários tipos de montagens dos componentes produzidos: a) Montagem com os campos magnéticos horizontais e verticais, b) Montagem com os campos magnéticos horizontais, c) Montagem com o campo magnético vertical e as placas de campo eléctrico, d) Montagem com o campo magnético vertical	44
Figura 5.2 – Distâncias máxima e mínima a que os varões de aço podem ficar: a) Distância mínima – 6 mm, b) Distância máxima – 34 mm.....	44
Figura 5.3 – Distância máxima e mínima das placas de campo eléctrico: a) Placas à distância máxima – 6 mm, b) Placas à distância mínima – 30 mm	45
Figura 5.4 – Estrutura de perfil Bosh com as placas de campo eléctrico na: a) horizontal; b) vertical	46
Figura 5.5 – Sistema produzido para a remoção do excesso de suspensão bacteriana à superfície.....	47
Figura 6.1 – Suspensões de bactérias utilizadas nos ensaios	49
Figura 6.2 – Dispositivo utilizado.....	50
Figura 6.3 – Imagem obtida com o microscópio da suspensão de bactérias após a deposição	51
Figura 6.4 – Imagem obtida com o microscópio com o filtro U-MWB ilustrativa dos resultados do 1º ensaio ...	51
Figura 6.5 – Imagem obtida com o microscópio com o filtro U-MWB ilustrativa dos resultados do 2º ensaio ...	52
Figura 6.6 – Imagem da suspensão bacteriana depositada sobre a amostra de alumínio.....	53
Figura 6.7 – Imagem observada ao microscópio com o filtro U-MWB ilustrativa dos resultados do 3º ensaio ...	53
Figura 6.8 – Gerador de campos magnéticos.....	54
Figura 6.9 – Imagem obtida ao microscópio da suspensão bacteriana aquando da aplicação do campo magnético	54
Figura 6.10 – Imagem obtida ao microscópio ilustrativa do 5º ensaio: a) utilizando o filtro U-MWB, b) utilizando o filtro U-MWU.....	55
Figura 6.11 – Fotografia da amostra de alumínio após 24h na incubadora.....	55
Figura 6.12 – Imagem obtida ao microscópio, com a utilização do filtro U-MWB, ilustrativa das bactérias negativas na matriz diagonal	56

Figura 6.13 – Imagem observada ao microscópio, com a utilização do filtro U-MWB, ilustrativa das bactérias positivas da matriz aleatória	56
Figura 6.14 - Imagem ilustrativa da mistura de bactérias positivas e negativas na matriz diagonal	57
Figura 6.15 – Amostra de aço colocada num tubo falcon contendo meio mineral e uma fonte de carbono para permitir o crescimento celular e o desenvolvimento de colónias.	58
Figura 6.16 – Incubadora utilizada	58
Figura 6.17 – Fotografia em que é possível visualizar o desenvolvimento de colónias de bactérias na superfície do aço.....	58
Figura 6.18 – Elementos fundamentais para a produção do campo eléctrico: a) fonte de tensão, b) placas de campo eléctrico.....	59
Figura 6.19 – Ilustração das placas de campo eléctrico, com os parâmetros A, B e C utilizados: A – Distância entre a parte interior das placas de campo eléctrico, B – Posição da amostra de material em relação da parte superior do acrílico das placas de campo eléctrico, C – Posição da suspensão de bactérias colocada sobre as amostras em análise, servindo a face da placa direita como referência	59
Figura 6.20 – Constatação ao microscópio da não existência de bactérias nas indentações	63
Figura 6.21 – Imagem captada ao microscópio da suspensão de bactérias negativas com nano partículas de óxido de ferro Fe^{3+}	63
Figura 6.22 – Lâmina de aço utilizada	63
Figura 6.23 – Aglomerados de bactérias crescidas em hexadecano com carga superficial positiva no seu meio de crescimento	64
Figura 6.24 – Imagem captada ao microscópio para: a) uma indentação repleta de suspensão bacteriana, b) um risco de uma lixa de polimento preenchida com suspensão bacteriana	66
Figura 6.25 – Evolução do limiar de detectabilidade com o tempo para a suspensão de bactérias: a) Positivas, b) Negativas.....	76
Figura 6.26 – Amostras colocadas nos tubos Falcon prontas para a etapa de revelação	79
Figura 6.27 - Imagens para a amostra de cobre, captadas ao microscópio utilizando o filtro U-MWU, para os tempos de revelação: a) 17h, b) 24h e c) 89h	81
Figura 6.28 – Fotomicrografia da superfície da amostra de aço para: a) matriz alternada; b) matriz reduzida.....	87
Figura A1: Principais componentes produzidos para adaptar à base do microscópio a) base a adaptar ao microscópio, b) cursor para o solenoide gerador de campos magnéticos verticais, c) base para o solenoide gerador de campos magnéticos verticais, d) suporte para o solenoide horizontal maior, e) suporte para o solenoide horizontal menor, f) placa de campo eléctrico para adaptar ao microscópio.....	viii
Figura A2 - Principais componentes produzidos para o sistema de placas eléctricas capazes de gerar um campo eléctrico mais homogéneo: a) placa para um campo eléctrico mais homogéneo, b) perfil bosh 1 e 2, c) perfil bosh sobre o qual se faz a rotação do dispositivo, d) base para acentar as amostras, e) suporte para as placas de campo eléctrico.....	xiv
Figura A3 - Principais componentes produzidos para o sistema de remoção de excesso das amostras: a) fixador de amostras com diferentes angulos de inclinação, b) base do sistema de lavagem, c) reservatório de água, d) suporte para o reservatório de água, e) suporte para o fixador de amostras.....	xx
Figura A 4 – Imagem ao microscópio de penetração e aderência de: a) 1 minuto para a amostra de cobre e para suspensão de bactérias positivas, b) 1 minuto para a amostra de alumínio e para a suspensão de bactérias positivas, c) 2 minutos para a amostra de alumínio e para a suspensão de bactérias positivas, d) 1 minuto para a amostra de aço e para a suspensão de bactérias positivas, e) 2 minutos para a amostra de aço e para a suspensão de bactérias positivas, f) 4 minutos para a amostra de PMMA e para a suspensão de bactérias positivas, g) 5 minutos para a amostra de PMMA e para a suspensão de bactérias positivas	xxiv

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Tipos de cargas utilizadas para produzir as matrizes de defeitos.....	36
Tabela 4.2 – Dimensão das diagonais de cada indentação	40
Tabela 6.1 – Condições utilizadas nos ensaios realizados usando apenas nano partículas de óxido de ferro Fe^{3+}	60
Tabela 6.2 – Ensaios realizados utilizando uma suspensão bacteriana, sujeita à aplicação de campos eléctricos.....	62
Tabela 6.3 – Imagens da etapa de deposição, para os dois tipos de bactérias, com imagens captadas por fotografia digital convencional (à esquerda em cada caso) e com recurso a um microscópio (à direita em cada caso)	65
Tabela 6.4 – Imagem de cada uma das amostras com a superfície totalmente limpa.....	68
Tabela 6.5 – Comparação entre a suspensão de bactérias positivas e negativas para os vários tempos na amostra de cobre.....	69
Tabela 6.6 – Comparação entre a suspensão de bactérias positivas e negativas para os vários tempos na amostra de alumínio.....	71
Tabela 6.7 – Comparação entre a suspensão de bactérias positivas e negativas para os vários tempos na amostra de aço.....	73
Tabela 6.8 – Comparação entre a suspensão de bactérias positivas e negativas para os vários tempos na amostra de PMMA.....	75
Tabela 6.9 – Comparativo entre bactérias positivas e negativas para as diversas amostras, utilizando o tempo óptimo de penetração e aderência destas.....	78
Tabela 6.10 - Comparativo para os vários tempos de revelação ensaiados para os diversos materiais sendo estas imagens captadas ao microscópio.....	83
Tabela 6.11 - Comparativo para os vários tempos de revelação ensaiados para os diversos materiais sendo estas imagens captadas com máquina fotográfica	84
Tabela 6.12 – Comparativo entre as fotos antes do início dos ensaios e depois de 24h de crescimento em etanol	86

SIGLAS

- END	Ensaaios Não Destrutivos
- LP	Líquidos Penetrantes
- PM	Partículas Magnéticas
- MIC	Corrosão Microbiologicamente Influenciada
- EPS	Substâncias Poliméricas Extra celulares

NOMENCLATURA

K	Constante electrostática
\vec{F}	Força eléctrica
q	Carga eléctrica
r	Distância entre cargas
E	Campo eléctrico
C	Capacitância de um condensador
V	Diferença de potencial
A	Área
\vec{B}	Campo magnético
\vec{F}_B	Força magnética
\vec{v}	Velocidade
i	Corrente eléctrica
n	Número de voltas por unidade de comprimento
ϵ_0	Constante de permissividade
d	Distância
f	Frequência
h	Capilaridade
T	Tempo

1. Introdução

1.1. Estado da Arte e Motivação

Os Ensaaios Não Destrutivos (END) consistem na aplicação de metodologias e técnicas de ensaio de modo a analisar materiais, peças ou mesmo equipamentos, para que desta forma se possam detectar possíveis defeitos existentes, sem que daí resulte alguma alteração nas propriedades do material ou até no desempenho funcional da peça.

Existem diversos tipos de END, sendo que a escolha do tipo de ensaio mais adequado a aplicar numa determinada situação, nos permite obter informações sobre o estado de degradação de um determinado componente, indicando os tipos de defeitos que possui, bem como a sua localização e a quantificação da sua dimensão. Os métodos mais usuais de ensaios não destrutivos são: a inspecção visual, os líquidos penetrantes, as partículas magnéticas, as correntes induzidas, os ultra-sons e os Raios X, existindo muitas outras variantes desta técnicas que também são vulgarmente aplicadas.

Os END são actualmente, técnicas valiosas, uma vez que permitem controlar o estado dos materiais e equipamentos, traduzindo-se este controle num aumento da fiabilidade da inspecção, numa minimização dos riscos e maior segurança, numa melhoria e optimização do funcionamento, bem como numa redução de custos, representando um factor de competitividade para as empresas que os utilizam. De uma forma sucinta pode-se dizer que a correcta aplicação dos END por parte da indústria, pode prevenir acidentes, salvar vidas, proteger o ambiente e evitar prejuízos económicos. Na Figura 1.1 estão indicados dois acidentes graves e que poderiam ter sido evitados se tivessem sido aplicados na altura correcta END nas estruturas e materiais que cederam. Assim, na Figura 1.1 a) pode observar-se o afundar do petroleiro Prestige em Espanha. Este acidente terá sido provocado pela existência de corrosão nos tanques do lastro, bem como devido à acumulação de danos estruturais no casco [1]. Na Figura 1.1 b), pode observar-se uma das graves consequências provocadas pelo derrame do petroleiro, sendo os ecossistemas da vida marítima, bem como das zonas costeiras próximas do local do acidente bastante afectados. Na Figura 1.1c) pode observar-se o acidente em que esteve envolvido o antigo piloto de Formula 1 Ayrton Senna, que marcou uma página negra no desporto automóvel. Este acidente ficou a dever-se a uma fractura do veio da direcção, consequência de uma soldadura mal executada.



Figura 1.1 – Exemplos de graves acidentes sucedidos: a) Quebra do casco do petroleiro Prestige [2], b) Demonstração das consequências ambientais do derrame de petróleo [3], c) Acidente de Ayrton Senna [4]

O esforço de investigação desenvolvido nesta tese concentra-se sobretudo no desenvolvimento de uma nova técnica de END. O aparecimento de novos materiais e de novas tecnologias de produção, bem como o uso de componentes de dimensões cada vez mais pequenas nas diversas indústrias, leva à necessidade do aparecimento de novas técnicas não destrutivas capazes de se adaptarem a esta evolução do mercado. Actualmente, os micro-defeitos apresentam cada vez maior importância, pelo que é de todo necessária a existência de técnicas capazes de detectarem de forma eficaz a existência destes micro-defeitos, que podem representar em muitas aplicações, graves problemas. As actuais técnicas de END não permitem detectar estes defeitos com a fiabilidade exigida em aplicações industriais de elevada responsabilidade, pelo que é necessário o desenvolvimento de técnicas capazes de fazer face a esta problemática.

Na indústria moderna, assiste-se ao rápido desenvolvimento de sistemas miniaturizados, estando o microfabrico presente em diversas áreas da ciência e tecnologia. A microfabricação tem permitido uma grande evolução em diversos equipamentos que estão presentes no nosso dia-a-dia, tais como: rádios, televisões, telemóveis, discos rígidos, computadores, automóveis [5]. Actualmente, indústrias ligadas a sectores como o automóvel, informático, entretenimento, telecomunicações e medicina são os que mais se evidenciam nesta área do microfabrico [5].

Relativamente às técnicas de END existentes, é possível encontrar com alguma facilidade um paralelismo entre a técnica de líquidos penetrantes (LP) e a técnica desenvolvida nesta tese, ensaios não destrutivos usando filmes de células bacterianas. A inspecção por LP é uma técnica bastante utilizada para a detecção de defeitos superficiais em materiais não porosos. A facilidade de aplicação, a simplicidade e o baixo custo de aplicação, fazem com que a técnica de LP seja uma das técnicas mais aplicadas na indústria moderna. Pode ainda ser aplicada em linhas de produção em que a velocidade de inspecção seja um factor importante na produção.

Hoje em dia, é bastante comum o uso de técnicas de ensaios não destrutivos de forma a detectar a presença de bactérias. Estas podem ser uma fonte de infecção em sistemas de abastecimento

de água, sistemas de ar condicionado e utensílios médicos, além de causarem perdas de transferência de massa e de energia em sistemas industriais.

O que representa uma inovação neste trabalho é o inverso, ou seja, a utilização de filmes de células bacterianas para a detecção de defeitos, conforme representado na Figura 1.2.

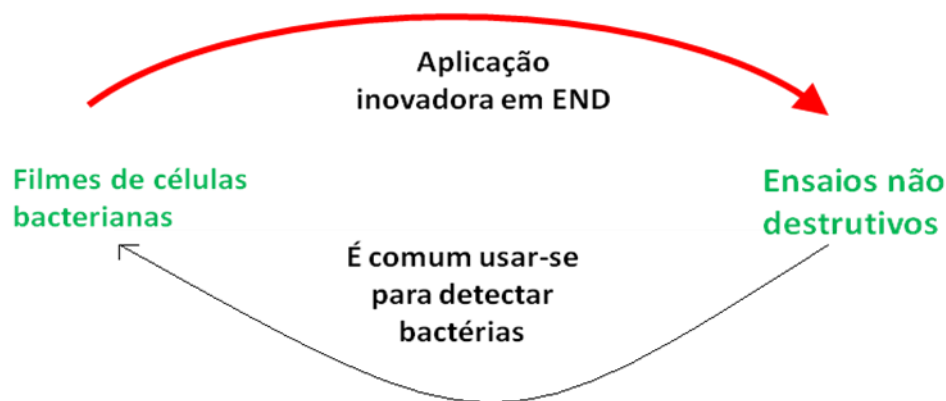


Figura 1.2 – Esquema representativo da relação actual entre filmes de células bacterianas e END

Um exemplo de aplicação de END para a detecção de bactérias está relacionado com a desagregação das rochas. Este é um fenómeno bem conhecido, que não é causado apenas por factores climáticos, tais como, mudanças de temperatura, a erosão provocada pelo vento e pela água, mas também pela poluição química (chuva ácida) e actividade microbiana [6]. Os microrganismos são encontrados na superfície da rocha, em fendas e em alguns casos, até mesmo dentro do espaço poroso de arenitos ou granitos [6]. São vários os tipos de rochas que são afectados, nomeadamente o arenito, granito, calcário, basalto, entre outras [6]. Esta degradação provocada pela actividade das bactérias pode acontecer em pedras para a construção, monumentos, igrejas [6]. Como técnicas não destrutivas utilizam-se habitualmente os raios-X.

Outra aplicação em que se faz uso de ensaios não destrutivos para detectar bactérias acontece na indústria da madeira [7]. As bactérias vão consumindo a madeira pelo que a sua presença desta é de todo indesejável, o que leva à aplicação de técnicas não destrutivas de forma a detectá-las, para que depois possam ser eliminadas de modo a garantir a durabilidade da madeira, bem como das aplicações que esta depois será aplicada. Neste caso da madeira, é comum usarem-se técnicas END por ultrassons [7].

É também frequente a aplicação de ensaios não destrutivos para a detecção de bactérias indesejáveis na indústria alimentar, na indústria médica e farmacêutica, entre muitas outras, existindo uma infinidade de áreas de aplicação.

Com este trabalho de investigação pretende utilizar-se as bactérias a nosso favor utilizando para isso as suas propriedades, nomeadamente a sua dimensão microscópica, mobilidade e aderência, de forma a identificar e dimensionar os defeitos superficiais existentes nos materiais.

Neste momento, não existe praticamente qualquer tipo de estudo desenvolvido, associado a esta ideia inovadora em que se baseia esta tese de mestrado, tendo-se apenas encontrado um estudo em que também se utilizam bactérias para fins de END, embora a metodologia dos ensaios efectuados fosse diferente da metodologia a desenvolver nesta tese [8]. O trabalho desenvolvido por Siores, Lamb, Swallow (2008), aborda a problemática de que as actuais técnicas de END apenas são capazes de identificar defeitos de algumas décimas de milímetro em materiais. A micro e nano escala dos END, necessita portanto de desenvolver novas técnicas capazes de identificar e dimensionar as imperfeições da superfície e mais importante, na “sub-superfície”. A garantia de confiança dos componentes que apresentam uma dimensão micro e especialmente nano, depende fortemente de novos desenvolvimentos na área dos END. O trabalho em análise apresenta uma tentativa de explorar o potencial de bactérias magnetotáticas para aplicações em END. Desde sua descoberta na década de 70, diferentes morfologias de bactérias magnetotáticas têm sido observadas e algumas foram cultivadas com sucesso.

Elias Siores e co-autores (2008) concluíram que as bactérias magnetotáticas apresentam dimensões de poucos micrómetros e que podem formar cristais de magnetite. Estes cristais são estruturados num arranjo com uma cadeia longa e polarizados numa direcção norte/sul, permitindo assim que as bactérias se comportem como entidades magnéticas. As bactérias magnetotáticas poderão então ser usadas para detectar falhas existentes em materiais, para detectar e mostrar a presença de fissuras, mesmo que estes apresentem dimensões reduzidas, da ordem dos nanómetros.

Esta tão escassa existência de trabalhos nesta área, fica a dever-se ao facto de se estarem a misturar duas áreas que podem parecer muito distantes, mas que em conjunto podem ser potenciadas de forma a constituírem uma técnica inovadora de END, capaz de se adaptar aos novos tipos de defeitos que vão surgindo com o aparecimento dos novos materiais e tecnologias. Esta é portanto uma ideia inovadora e pioneira e com grande potencial.

1.2. Objectivos

Com esta tese pretendeu-se iniciar o estudo de uma técnica inovadora de END, que se baseia numa ideia algo radical que utiliza filmes de células bacterianas para a detecção de defeitos. Os objectivos definidos foram:

- Utilizar a dimensão microscópica, a aderência e as propriedades de mobilidade de células bacterianas, de forma a identificar, dimensionar e caracterizar os defeitos existentes nos materiais analisados;
- Avaliar experimentalmente a inadequação das técnicas de ensaios não destrutivos já existentes, na detecção de micro-defeitos superficiais existentes em materiais de engenharia sujeitos a processos tecnológicos;
- Desenvolver várias metodologias inovadoras de END baseadas em filmes de células bacterianas que permitam a detecção de defeitos com aquelas morfologias;
- Caracterizar experimentalmente a fiabilidade das técnicas que foram desenvolvidas, de forma a comprovar a qualidade das mesmas para que assim possam vir a ser, num futuro próximo, aplicadas nos diversos tipos de indústrias existentes.

1.3. Impacto Industrial e Aplicação do Trabalho Desenvolvido

A utilização dos END está cada vez mais ligada a um universo mais alargado de indústrias e a diversos mercados, que procuram, com a utilização destas técnicas, melhorar os seus produtos e desta forma conseguirem garantir a qualidade destes aos seus clientes. É assim também uma forma de aumentar a competitividade entre as empresas, na busca de produzirem produtos cada vez melhores.

Devido à vasta gama de materiais, bem como a uma gama enorme de defeitos em que se pensa ser possível aplicar esta técnica inovadora de END usando células bacterianas, faz com que esta técnica a desenvolver possa vir a ter uma boa aceitação por parte do mercado, numa vasta gama de indústrias, sendo a do microfabrico aquela a que mais se adequará.

2. Revisão do Estado da Arte

2.1. Introdução

Neste capítulo do trabalho, irá ser apresentado o resultado da pesquisa bibliográfica efectuada. Serão abordadas e apresentadas várias áreas relacionadas com o trabalho a desenvolver, nomeadamente, os END, as técnicas de LP, e também serão abordados alguns conceitos relacionados com a adesão e os biofilmes. Por fim, efectuar-se-á a análise do único artigo encontrado com uma ideia de END algo semelhante à que se pretende nesta tese, embora as metodologias de teste utilizadas para a concretizar sejam bastante diferentes.

2.2. Ensaaios Não Destrutivos

Os END consistem na realização de um conjunto de testes aos equipamentos, peças e materiais de modo a identificar possíveis danos estruturais que comprometam a actividade e desempenho nas suas operações, sem prejudicar posteriormente a utilização dos produtos inspeccionados. Os END incluem diversos métodos de análise a materiais, componentes e ligações capazes de identificar e quantificar os seus defeitos, sendo esta uma ferramenta essencial com que os especialistas de segurança devem estar familiarizados para que possam agir de forma preventiva.

Já se passaram bastantes anos desde que se começaram a utilizar END, encontrando-se nos dias de hoje enraizada a importância e a necessidade de os fazer.

Os END são largamente utilizados em sectores como o do petróleo e petroquímico, aeronáutico, aeroespacial, siderurgia, naval, electrónico, mecânico, na indústria farmacêutica, na restauração, na arte, estando basicamente presente em quase todas as áreas que nos rodeiam.

Para que se possam obter resultados satisfatórios e válidos, é necessário ter em conta diversos requisitos de forma a garantir bons resultados dos ensaios a efectuar:

- Pessoal treinado, qualificado e certificado;
- Equipamentos calibrados;
- Procedimentos de execução de ensaios qualificados com base em normas e critérios de aceitação previamente definidos e estabelecido.

Os ensaios não destrutivos podem ser aplicados em diversas fases na indústria, nomeadamente [1]:

- 1- Inspeção do material base (matéria-prima) antes de ser processada;
- 2- Inspeção dos produtos durante o seu processo de fabrico;
- 3- Inspeção dos produtos no fim do seu processo de fabrico;
- 4- Inspeção dos produtos ao longo do seu tempo de vida de utilização.

2.3. Ensaios Não Destrutivos por Líquidos Penetrantes (LP)

A técnica de END de inspeção por LP é um método bastante utilizado para a detecção de defeitos superficiais e em materiais não porosos. Este método, remonta ao início do século XIX, antes da primeira guerra mundial, sendo nessa altura principalmente utilizado pela indústria ferroviária na inspeção das linhas de caminho de ferro [1,9]. Foi por volta de 1942, nos EUA, que foi desenvolvido o método de penetrantes fluorescentes [9]. Nesta época, o ensaio foi adoptado pelas indústrias aeronáuticas, que trabalhavam com ligas não ferrosas, e visto isto, necessitavam um método que detectasse defeitos superficiais, diferente do ensaio por partículas magnéticas (pois este ensaio não é aplicável a materiais não magnéticos) [9]. Daí em diante, o método foi sofrendo um processo de desenvolvimento constante, através do aparecimento de novos produtos utilizados no ensaio, até ao seu estado actual [9].

É uma técnica que pode ser utilizada em materiais magnéticos, assim como nos não-magnéticos, em materiais metálicos ou não-metálicos, em ligas de alumínio, ligas de titânio, magnésio, bronzes, latões, vidros, cerâmicos, plásticos, entre outros [1, 9].

O ensaio baseia-se na utilização de um líquido penetrante que é aplicado sobre a superfície previamente limpa da peça a inspeccionar, e que por capilaridade preenche os defeitos existentes à superfície [1]. O líquido penetrante permanece algum tempo à superfície até ser removido o excesso. Pode ser aplicado um produto absorvente, o revelador, que aumenta a visibilidade do defeito [9].

Um líquido penetrante com boas características, deve ter as seguintes características:

- ter a capacidade para penetrar de forma rápida em fissuras finas;
- ter a capacidade de permanecer em fissuras relativamente pequenas;
- não evaporar ou secar de uma forma rápida;
- ser facilmente limpo da superfície em que seja aplicado;

- sair das discontinuidades no mínimo tempo possível, na altura em que é aplicado o revelador;
- ter um forte brilho (cor ou fluorescente);
- ter baixo custo.

Os LP dependem sobretudo de quatro factores principais, nomeadamente, a capilaridade, a molhabilidade, a viscosidade e a coloração. A capilaridade é a capacidade que os líquidos têm para subir espontaneamente no interior de um espaço estreito, como por exemplo num tubo fino [1]. A molhabilidade é a propriedade que um líquido tem em se espalhar por toda a superfície, não se juntando em porções ou gotas, sendo esta maior quanto menor for o ângulo de contacto do líquido com a superfície sólida [1, 9].

O líquido penetrante deve ser escolhido de acordo com a sua sensibilidade (aptidão que o penetrante tem para revelar discontinuidades pequenas e estreitas) e deve-se também ter em conta a qualidade superficial da peça a analisar, bem como a morfologia e dimensão dos defeitos. Devem-se conjugar as condições anteriores, de forma a encontrar o penetrante que melhor se adequa a elas e que possua o menor custo associado.

O processo de aplicação da técnica dos líquidos penetrantes é composto por seis etapas principais [1, 9]:

1. Preparação da superfície (Figura 2.1) – nesta etapa deve limpar-se de forma rigorosa a superfície do material a analisar, removendo toda e qualquer sujidade (resíduos, poeiras, produtos químicos, entre outros) de modo a que esta não perturbe a acção de entrada e saída do LP das fissuras.

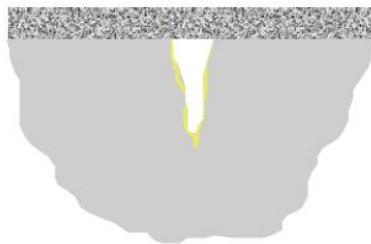


Figura 2.1 – Preparação e limpeza inicial da superfície [9]

2. Aplicação do penetrante (Figura 2.2) – Consiste na aplicação de um LP, de modo a que este forme um filme sobre a superfície que se pretende inspeccionar e que por acção da capilaridade do LP, este penetre nas discontinuidades existentes. Deve deixar-se passar algum tempo para que o LP penetre completamente.



Figura 2.2 – Penetração do LP na fissura [9]

3. Remoção do excesso de penetrante (Figura 2.3) - Consiste na remoção do penetrante que se encontra em excesso na superfície do material, através de produtos adequados com o tipo de líquido penetrante aplicado, devendo a superfície do material ficar livre de qualquer resíduo.

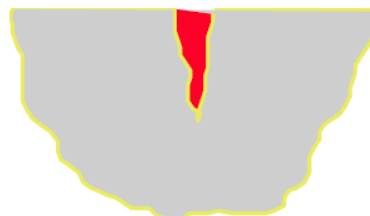


Figura 2.3 – Remoção do excesso de LP da superfície [9]

4. Aplicação de um revelador/revelação (Figura 2.4) - Consiste na aplicação de um filme uniforme de revelador sobre a superfície. O revelador é usualmente um pó fino de cor branca. O revelador absorve o penetrante das discontinuidades, possibilitando desta forma que possamos detectar as anomalias. Deve ser previsto um determinado período de tempo de revelação para o sucesso do ensaio.



Figura 2.4 – Aplicação do revelador [9]

5. Avaliação e inspeção (Figura 2.5) - Após a aplicação do revelador, as indicações começam a ser observadas, através do aparecimento de uma mancha causada pela absorção do penetrante

contido nas discontinuidades. Descobertas as discontinuidades, estas posteriormente serão avaliadas de forma a verificar se são prejudiciais ou não.

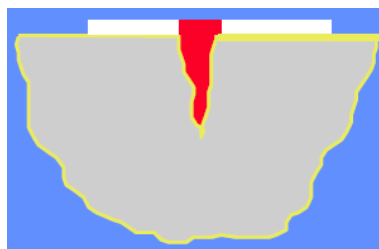


Figura 2.5 – Absorção do LP pelo revelador [9]

6. Limpeza final - A etapa final consiste na limpeza de todos os resíduos e produtos usados durante o ensaio, visto que, a presença destes podem ser prejudiciais numa etapa posterior em que se pretenda trabalhar a peça (soldadura, pintura...).

2.4. Microfabricação

A microfabricação surge devido à necessidade de miniaturização de diversos tipos de componentes e com o aparecimento de novos materiais e tecnologias [1].

A comunidade científica tem assistido, nas últimas décadas, ao surgimento, ao crescimento e à consolidação de uma nova tendência a nível mundial: a miniaturização. Em diferentes ramos da ciência é comum e cada vez mais necessário, o uso de dispositivos miniaturizados [5].

A miniaturização de dispositivos electrónicos surgiu por volta da década de 60 e provocou uma grande revolução em diversas tecnologias [5, 10]. Ainda nos anos 70 a IBM lançou a cabeça de impressoras a jacto-de-tinta. No início dos anos 80 surgiu o acelerómetro, que era utilizado nos sistemas de travagem antibloqueio (ABS), nas suspensões activas e, principalmente, nos Airbags [10]. Sucederam-se, até aos dias de hoje, muitas mais inovações no que diz respeito ao microfabrico.

O rápido desenvolvimento de sistemas miniaturizados, em diversas áreas da ciência e tecnologias, tem levado a um progresso enorme em diversos equipamentos que estão presentes no nosso dia-a-dia tais como: rádios, televisões, telemóveis, discos rígidos e micro-computadores. Actualmente, indústrias ligadas a sectores como o automóvel, informático, entretenimento, telecomunicações e medicina são os que mais se evidenciam nesta área do microfabrico [5].

A indústria de electrónica é sem duvida, aquela que mais aplica a microfabricação nos dias que correm, visto que, a cada dia que passa vamos tendo novos equipamentos com dimensões cada vez

mais reduzidas e com cada vez mais novas funções tecnológicas. Diversas tecnologias que até à pouco tempo se pensavam ser inviáveis, foram possíveis com redução da escala dos componentes [11]. Um dos grandes problemas a ter em conta no processo de miniaturização é que a tecnologia utilizada para macro-componentes não pode ser proporcionalmente escalonada e aplicada para as micro-peças, pois pode levar a que surjam diversos tipos de problemas [11].

Na Figura 2.6 tem-se a comparação entre um micro-componente e uma formiga, de modo a que se possa ter uma ideia da ordem de grandeza dos componentes produzidos no microfabrico [11]. Considera-se que a microfabricação diz respeito a qualquer componente com dimensões inferiores a 500 μm , ou de maior dimensão, mas com um pormenor de inferior a 500 μm [1].



Figura 2.6 - Comparação de um micro-componente com uma formiga [11]

Existem diversos tipos de tecnologias chave associadas à microfabricação, tais como [1]:

- Projecto: programas informáticos de simulação para otimizar o processo de fabricação (simulação tecnológica) e o funcionamento do dispositivo (simulação funcional);
- Tecnologias para produção de equipamentos para microfabricação: sistemas servo-assistidos, hidrostáticos, de movimentação de precisão, tratamento e compensação de erros e elementos de transmissão;
- Tecnologias de processamento: adição controlada de material;
- Tecnologias de micro-maquinação: Electrical Discharge Machining (EDM), laser, torneamento, fresagem;
- Tecnologias de replicação: obtenção do micro-componente por micro-injecção, e estampagem a quente (hot embossing);
- Tecnologias de micro-montagem: micro-posicionamento, montagem complexa;
- Tecnologias de caracterização – mecânica, óptica, química, dimensional.

Ao processo de microfabricação está associado um variado leque de possíveis tipos de dificuldades que podem suceder durante o processo de fabrico, devido à dimensão reduzida de todos os seus intervenientes.

2.5. Fundamentos Sobre Força Eléctrica, Campo Eléctrico, Condensadores de Placas Paralelas e Campo Magnético

No âmbito deste trabalho foi desenvolvida e testada uma metodologia de END em filmes de células bacterianas com propriedades eléctricas e magnéticas. Conforme descrito no Capítulo 3, foi necessário desenvolver algum equipamento laboratorial para implementar esta metodologia. Esse equipamento envolve a aplicação de campos eléctricos e magnéticos durante a fase de penetração e aderência das bactérias. Nesse sentido serão revistos brevemente alguns conceitos importantes como os do campo eléctrico e magnético.

A intensidade da interacção eléctrica de uma partícula com os objectos que se encontram ao seu redor depende da sua carga eléctrica. Os objectos carregados interagem entre si, exercendo forças uns sobre os outros. Tal como se pode observar na Figura 2.7, as cargas com o mesmo sinal eléctrico repelem-se, enquanto que entre cargas com sinal oposto verifica-se que existe uma atracção. [12]

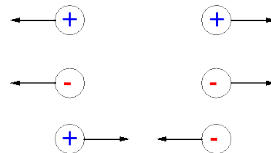


Figura 2.7 – Efeito de atracção/repulsão nas cargas eléctricas [13]

Considerando duas partículas carregadas com intensidades de carga q_1 e q_2 , e que se encontram a uma distância r uma da outra, pode determinar-se a força electrostática de atracção ou repulsão entre estas através da lei de Coulomb, que é dada pela equação 1.1 e em que k é uma constante electrostática e tem como valor $8,99 \times 10^9 N.m^2/C^2$ [12].

$$F = k \frac{|q_1||q_2|}{r^2} \quad (1.1)$$

No caso em que se têm n partículas carregadas, elas interagem independentemente aos pares, sendo a força resultante em cada uma das partículas dada pela soma vectorial que vem na equação 1.2, onde por exemplo $\vec{F}_{i,j}$ é a força sobre a partícula i devido à presença da partícula j .

$$\vec{F}_{i,res} = \vec{F}_{i,j} + \vec{F}_{i,k} + \dots + \vec{F}_{i,n} \quad (1.2)$$

O campo eléctrico é um campo vectorial, em que a direcção e o sentido de \vec{E} são os da força \vec{F} que age sobre a carga de teste positiva, e vem dado pela equação 1.3 [12].

$$\vec{E} = \frac{\vec{F}}{q_0} \leftrightarrow \vec{F} = \vec{E} \cdot q \quad (1.3)$$

Michael Faraday (1791 - 1867) foi quem introduziu a ideia de campos eléctricos, bem como a das linhas de campo eléctrico. Por definição, a linha de campo eléctrico é uma linha imaginária, tangente ao vector campo eléctrico em cada um dos seus pontos, que indicam o sentido da força eléctrica sobre uma carga de teste $q_0(+)$ colocada num campo eléctrico. É orientada no mesmo sentido do vector campo eléctrico. Podem definir-se algumas relações entre as linhas de campo eléctrico e os vectores campo eléctrico, tais como: em qualquer ponto, o campo eléctrico é dado pela recta tangente à linha de campo eléctrico; quanto mais próximas se encontram as linhas de campo umas das outras, mais forte é o campo eléctrico.

Um campo eléctrico uniforme é aquele que possui em todos os seus pontos a mesma direcção e mesmo sentido, bem como também a mesma intensidade.

Um exemplo de um campo eléctrico uniforme encontra-se representado na Figura 2.8, em que se têm duas placas condutoras planas, paralelas e próximas, carregadas com cargas de mesmo valor absoluto e sinais opostos, podendo visualizar-se que as linhas de campo eléctrico são paralelas entre si e perpendiculares as placas.

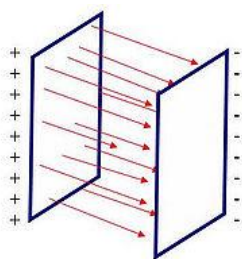


Figura 2.8 – Campo eléctrico uniforme [14]

Um modo de armazenar energia potencial, pode ser feita através da utilização de um condensador, que permite armazenar energia potencial num campo eléctrico.

Na Figura 2.9 apresenta-se um exemplo de um condensador de placas paralelas, sendo este constituído por duas placas de área A e separadas uma da outra por uma distância d . Nesta figura é possível observar-se as linhas de campo eléctrico, sendo o campo eléctrico uniforme na zona entre as placas.

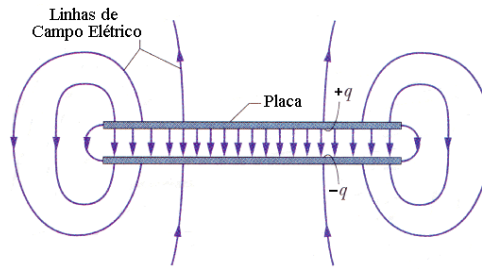


Figura 2.9 – Condensador de placas paralelas [15]

Visto que as placas são condutoras, estas são superfícies equipotenciais, ou seja, todos os pontos de uma placa possuem o mesmo potencial eléctrico, existindo uma diferença de potencial entre as placas. A carga q varia com a diferença de potencial V , existindo uma relação de proporcionalidade entre estas variáveis dada pela equação 1.4 e em que C é a capacitância do condensador, e depende exclusivamente da geometria das placas. [12]

$$q = CV \quad (1.4)$$

Uma maneira de se carregar um condensador, pode ser feita através da colocação deste num circuito eléctrico, utilizando para isso uma bateria como se pode observar na Figura 2.10. Um circuito eléctrico é um percurso através do qual as cargas podem fluir, sendo a bateria que mantém uma certa diferença de potencial entre os seus terminais. [12]

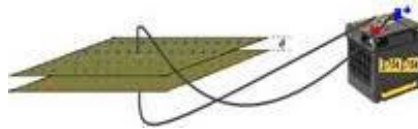


Figura 2.10 – Ligação entre duas placas paralelas e uma bateria [16]

A relação de um campo eléctrico entre as placas de um condensador com a carga q que cada uma das placas possui, pode ser obtida pela utilização da Lei de Gauss que é dada pela equação 1.5 [12].

$$\epsilon_0 \oint \vec{E} \cdot d\vec{A} = q \quad (1.5)$$

O integral $\oint \vec{E} \cdot d\vec{A}$ está relacionado com o fluxo eléctrico resultante através da superfície, enquanto que q é a carga envolvida por uma superfície gaussiana. Por norma considera-se que o fluxo eléctrico que atravessa a superfície gaussiana, tem uma intensidade E uniforme e os vectores \vec{E} e $d\vec{A}$ são paralelos entre si. Assim a equação 1.5 pode ser apresentada de uma forma bem mais simplificada que se apresenta na equação 1.6, em que A é a área da superfície gaussiana que é atravessada pelo fluxo eléctrico [12].

$$q = \varepsilon_0 EA \quad (1.6)$$

A diferença de potencial existente entre as placas de um condensador é dada pela equação 1.7 [12].

$$V_f - V_i = - \int_i^f \vec{E} \cdot d\vec{s} \quad (1.7)$$

Este integral deve ser calculado ao longo de qualquer percurso que comece numa placa e termine na outra. No caso de se escolher um percurso de uma linha de campo eléctrico que vai da placa negativa para a placa positiva, os vectores \vec{E} e $d\vec{s}$ terão a mesma direcção, mas sentidos opostos, pelo que o produto escalar da equação anterior será igual a $-\vec{E}d\vec{s}$. Assim, visto isto, a equação 1.7 pode ser representada pela equação 1.8 [12].

$$V = \int_-^+ E ds \quad (1.8)$$

Em que V representa a diferença $V_f - V_i$ e os sinais - e + representam o percurso da placa negativa para a placa positiva.

A partir da equação 1.8 e para o caso de um condensador de placas paralelas e sabendo que E é constante obtém-se a equação 1.9.

$$V = E \int_0^d ds = Ed \leftrightarrow E = \frac{V}{d} \quad (1.9)$$

Assim a capacitância de um condensador de placas paralelas é dada pela equação 1.10 [12].

$$C = \frac{\varepsilon_0 A}{d} \quad (1.10)$$

Passando aos campos magnéticos, pode-se dizer que um campo magnético, \vec{B} , pode ser definido como a força \vec{F}_B que actua sobre uma partícula de teste com carga q e que se move através do campo com velocidade \vec{v} e é dado pela equação 1.11 [12].

$$\vec{F}_B = q\vec{v} \times \vec{B} \quad (1.11)$$

Uma maneira vulgar de se conseguir um íman, consiste na utilização de uma bobina de fio enrolada em torno de um núcleo de ferro, fazendo-se passar por esta uma corrente eléctrica, sendo a intensidade do campo magnético dependente da intensidade da corrente eléctrica.

As linhas de campo magnético são linhas que saem por uma extremidade de um íman (pólo norte) e entram pela outra extremidade (pólo sul).

A lei de Ampère pode ser traduzida pela equação 1.12 [12]. O integral linha nesta equação é calculado em torno de uma curva fechada envolvendo as correntes eléctricas existentes. A corrente i é a corrente resultante envolta pela curva [12].

$$\oint \vec{B} \cdot d\vec{s} = \mu_0 i_{env} \quad (1.12)$$

Uma das aplicações em que se torna útil a utilização da lei de Ampère é para o caso do solenoide ou bobina espiral, como a que se observa na Figura 2.11, podendo também observar-se como se posicionam as linhas de campo magnético. O campo magnético do solenoide é a soma vectorial dos campos produzidos por cada uma das espiras que o compõem.

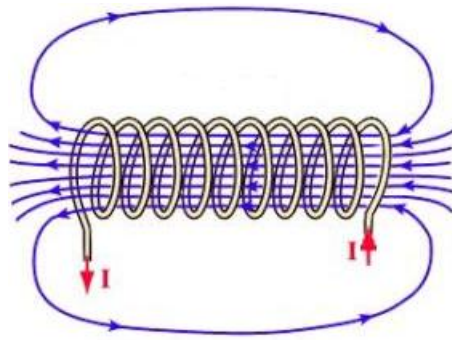


Figura 2.11 – Solenoide em que passa uma corrente i [17]

Para o caso do solenoide ideal e após a realização de algumas simplificações resultantes da aplicação da lei de Ampère pode chegar-se à equação 1.13 para o cálculo do campo magnético de um solenoide [12]:

$$B = \mu_0 i n \quad (1.13)$$

Em suma, as equações fundamentais desta revisão efectuada sobre conteúdos eléctricos e magnéticos para a aplicação nesta investigação são:

- A equação 1.3, pois permite determinar a força a que a carga (bactéria), fica sujeita quando se encontra sobre a influência de um campo eléctrico;
- A equação 1.9, visto que, é com esta equação que se pode calcular o campo eléctrico, a que as bactérias ficam sujeitas, existente no condensador;
- A equação 1.11, pois permite o cálculo da força magnética a que as bactérias se encontram sujeitas;
- A equação 1.13, pois permite o cálculo do campo magnético que um solenoide ideal consegue gerar.

2.6. Fundamentos Sobre Adesão e Biofilmes

A adesão de células bacterianas a superfícies deve-se a várias forças de atracção que incluem forças de van der Waals, movimento Browniano, forças gravitacionais, cargas electrostáticas e interacções hidrofóbicas, bem como a interacções moleculares e celulares devido à produção de

polímeros, cápsulas e flagelos [18 - 20]. O processo de adesão inclui uma fase inicial instantânea e reversível (primeira fase) e passado um certo período de tempo passa a ter-se uma fase irreversível de adesão celular (fase dois), visto que, as reacções entre as estruturas moleculares da superfície bacteriana e as superfícies do substrato tornam-se predominantes [18]. Os passos iniciais de adesão, são habitualmente explicados como resultantes de forças electrostáticas e de van der Waals entre as células bacterianas e a superfície, tal como explicado pela teoria DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey, and Overbeek).

É um processo complexo que é afectado por diversos factores, tais como, as características e a concentração das bactérias, a superfície do material alvo, a temperatura, o período de tempo de exposição, a presença de proteínas e de substâncias bactericidas. Uma boa compreensão de todos estes factores faz com que se ter um bom controlo do processo de adesão [18].

No caso desta técnica de END em filmes de células bacterianas que se está a desenvolver, importa frisar que se pretende parar o processo de adesão antes de haver a formação de biofilmes, para não haver problemas, pelo que só se irá trabalhar na zona de adesão reversível.

Considera-se tradicionalmente que as bactérias crescem em populações homogéneas [21]. Os biofilmes bacterianos são formados por adesão de células umas às outras e às superfícies através de uma matriz exo-polimérica e são constituídos por indivíduos unicelulares, as bactérias, e por outras partículas aprisionadas bióticas (vivas) ou abióticas (inertes), formando desta forma uma comunidade sedentária mas dinâmica dentro de uma estrutura complexa, apresentando heterogeneidade espacial e funcional [19, 21 - 25]. Essa matriz é importante tanto na formação e estrutura do biofilme, mas também para a protecção das células, uma vez que pode conferir protecção contra agressões ambientais, como a radiação UV, variações de pH, choque osmótico e secagem [19, 26, 27].

A formação de biofilme bacteriano deve, necessariamente, começar com a adesão de um pequeno número de células bacterianas a uma superfície [28]. Esta forma de auto-imobilização de biomassa ocorre quando as superfícies contactam água, uma vez que é necessário um nível de humidade que permita a manutenção da viabilidade das células [26]. O biofilme é uma função não só das condições físico-químicas, mas também da morfologia das células [29]. A estrutura geométrica de um biofilme é o arranjo espacial das partículas que o compõem, apresentando esta estrutura uma notável complexidade [22]. Pode dizer-se que os biofilmes são a forma mais bem sucedida de colonialismo do mundo pois podem existir em solos, sedimentos, plantas, animais e superfícies, mesmo sob ambientes extremos [19, 30].

A agregação de células é vantajosa e necessária em vários processos, nomeadamente no tratamento biológico de águas residuais [19]. No entanto, eles constituem um sério problema em muitos processos industriais (por exemplo, na produção de alimentos, papel, cosméticos e fármacos) [19, 24, 25, 31]. Quase 99% dos micro-organismos que vivem na Terra, existem em comunidades

microbianas conhecidas como biofilmes [19, 32]. Biofilmes fossilizados com 3,5 bilhões de anos estão entre os registos mais antigos de vida na terra [19].

Os biofilmes também exibem por vezes propriedades únicas, tais como a tolerância e resistência a múltiplas drogas e biocidas o que lhes permite sobreviver em condições ambientais hostis e adversas [21, 25, 33, 34]. Os biocidas são compostos químicos que possuem a capacidade de inibir o crescimento microbiano ou até mesmo matar micro-organismos [19]. A acção do biocida depende de vários factores tais como: (i) químicos (por exemplo o pH); (ii) do tipo e número de micro-organismos (por exemplo, tolerância / resistência, estado metabólico, número de células na população); (iii) ambiente (temperatura, tipo de superfície, por exemplo, actividade de água, presença de outros compostos reactivos) [19]. Os biocidas e desinfectantes são utilizados com alguma frequência para eliminar biofilmes, pois a limpeza mecânica é muitas vezes cara e ou impraticável [25, 35]. No entanto, a remoção do biofilme e morte das células são processos distintos, existindo alguns tratamentos que podem causar morte destas, mas não a remoção e vice-versa [25, 35]. Compostos de anti-adesão que interferem com a adesão bacteriana ou que iniciam a desagregação de células das superfícies, aparecem como uma boa alternativa [25, 35].

Esta comunidade reúne espécies diferentes numa estrutura em que estas podem cooperar, ao invés de competir [24]. Todos estes padrões de comportamento são orquestrados pela comunicação, que pode ser química ou genética [24, 36]. O biofilme constitui assim, uma forma única para estabilizar as interações entre as espécies, induzindo mudanças marcantes nas relações simbióticas entre eles e que afectam o funcionamento da comunidade microbiana [24, 37].

Perante as condicionantes ambientais existentes os biofilmes representam uma forma única de gerar diversidade genética e, adicionalmente, conduzir à evolução [24]. O surgimento de novas sub-populações, tais como colónias de pequenas variantes (diversificação genética ou adaptativa), persistentes, e com células tolerantes às restrições impostas, representa um novo desafio para microbiologistas [24]. Seja qual for a espécie bacteriana envolvida e a complexidade da comunidade resultante, a formação de um biofilme é um processo dinâmico e dependente de sinais ambientais, passando por um ciclo de crescimento de cinco estágios principais consistindo na adesão reversível, adesão irreversível, maturação, manutenção e as fases de dispersão, independentemente do fenótipo dos microrganismos constituintes [23, 38].

Na Figura 2.12 encontra-se a representação de um modelo de desenvolvimento de um biofilme bacteriano em que se apresentam as suas principais etapas, sendo este modelo comum para muitas espécies de bactérias. Convém no entanto salientar que para a técnica que se vai desenvolver de END em filmes de células bacterianas, não se pretende de todo a formação de biofilmes e trabalhar-se-á sempre no domínio de adesão reversível, de modo a obterem-se bons resultados e sem se por em causa os materiais a estudar.

De acordo com a Figura 2.12 pode-se compreender melhor o que acontece em cada uma das etapas da formação e maturação do biofilme [24, 30]. A primeira etapa envolve a adesão reversível das células bacterianas a uma superfície [24, 30]. Na maturação para a fase 2, as células de bactérias segregam substâncias exopoliméricas e a adesão torna-se irreversível (caso não exista intervenção mecânica ou química) [24, 30]. Após a adesão irreversível das bactérias à superfície, inicia-se o processo de maturação do biofilme [24, 30]. A fase 3 denota uma maturidade precoce, em que começa a aparecer uma arquitetura tridimensional [24, 30]. Na fase 4, esta arquitetura torna-se bastante mais complexa encontrando-se em crescimento contínuo, considerando-se nesta fase que o biofilme se encontra totalmente maduro [24, 30]. A fase 5 é chamada de dispersão e ocorre quando o biofilme atinge uma determinada massa crítica e o equilíbrio dinâmico é alcançado. As camadas mais externas do biofilme começam a libertar células bacterianas, que se podem rapidamente dispersar e multiplicar, levando a colonização de novas superfícies e à organização novos biofilmes em novos locais [24, 30].

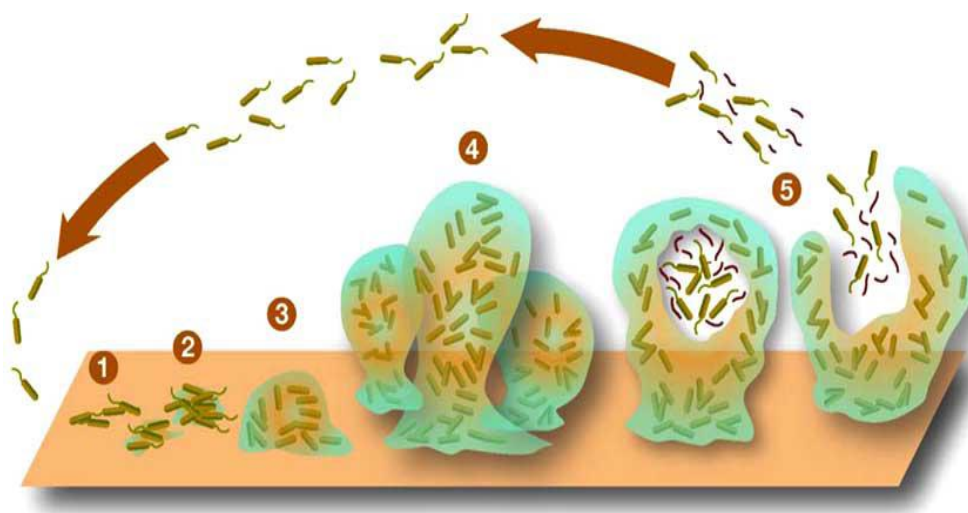


Figura 2.12 - Modelo de desenvolvimento de um biofilme bacteriano [30]

2.7. Efeito Anti-Bacteriano do Cobre

Após efectuar-se uma pesquisa constatou-se a existência de vários estudos que indicam que o cobre é um material fortemente anti-bacteriano, ou seja, as bactérias acabam por morrer quando em contacto com o cobre [39 - 44].

Os resultados gerados até ao momento sugerem que as bactérias são mortas rapidamente em superfícies de cobre seco [42, 43]. Esta acção rápida pode, em parte, explicar-se devido à ausência significativa de bactérias patogénicas resistentes ao cobre [42]. Um estudo preliminar indicou que as

bactérias não têm tempo para desenvolver biofilmes em condições de seca, e as condições de sobrevivência são diferentes das dos sistemas aquosos [42]. Assim, pode supor-se que, mesmo que um organismo tenha tolerância ao cobre em ambientes aquosos, isso não lhe garante sobreviver em superfícies de cobre seco [42]. No caso de superfícies de cobre seco, para além do efeito antibacteriano do material, as células bacterianas também estão sujeitas ao fenómeno da desidratação.

A morte rápida de bactérias por superfícies de cobre sólido está a receber uma crescente atenção. Em experiências laboratoriais foi demonstrado que muitas espécies de bactérias, como *Escherichia coli* O157, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium difficile*, e *Mycobacterium tuberculosis*, são eficientemente mortas em superfícies de ligas de cobre [42, 43].

Estudos recentes têm mostrado que as superfícies de cobre são muito mais eficazes para matar completamente as três estirpes mais prevalentes de epidemia de MRSA no Reino Unido do que superfícies de aço inoxidável [39, 41, 44]. No entanto, o aço inoxidável é ainda o material preferido pelas administrações hospitalares. Existem vários estudos que consideram que o cobre deve ser re-introduzido em hospitais e ambientes de cuidados de saúde, devendo estar presentes em componentes tais como placas de portas e puxadores, calhas de cama e carrinhos de funcionamento, entre outros. Assim, o cobre, como uma superfície anti-bacteriana pode desempenhar um papel de ajuda e no controle de bactérias responsáveis por infecções adquiridas no hospital. [39 - 44].

A actividade antimicrobiana de ligas de cobre foi até recentemente registado na Agência de Protecção Ambiental (EPA) dos EUA como o primeiro material sólido antimicrobiano [42, 43, 46]. Já no tempo do Império Romano o cobre era utilizado em sistemas de tubulação de água, talheres, painéis, muito antes da existência de micro-organismos ser conhecida [19, 39].

2.8. Biocorrosão em Metais

As bactérias são consideradas como os colonizadores primários de superfícies inanimadas em diversos ambientes, quer estes sejam naturais ou artificiais [46]. Biocorrosão é um termo utilizado para quando se tem a deterioração do metal como resultado da actividade microbiana (corrosão microbiologicamente influenciada, mais conhecida por MIC) [19, 47 - 50].

As ligas metálicas são particularmente susceptíveis à acção microbiana, podendo disso resultar em corrosão e formação de incrustações [19]. As bactérias ao crescerem em ambientes metálicos acabam por corroer as superfícies por mecanismos electroquímicos [50]. Estes mecanismos variam de acordo com as espécies microbianas e a química da superfície do metal colonizado [46].

As taxas de reacções microbianas são limitadas por factores ambientais e disponibilidade de nutrientes [49]. A colonização microbiana de metais e ligas de uso industrial tem lugar através da interacção de biofilmes de bactérias, substâncias poliméricas extracelulares (EPS), iões metálicos e, principalmente água [47, 49, 50]. Os biofilmes e as bactérias associadas formam complexos sistemas biológicos que podem causar diversas alterações químicas na interface metal / biofilme, como a produção de gradientes de pH, níveis de oxigénio, cloreto e sulfato e concentração de iões [47 - 49].

Investigações recentes em biocorrosão, têm-se concentrado na influência das enzimas neste processo [46, 50]. As actividades enzimáticas são facilmente detectadas em biofilmes, no entanto, a importância destas reacções mediadas por enzimas só recentemente foi considerada como relevante para a biocorrosão [46]. As enzimas estão envolvidas em reacções redox, facilitando o processo de corrosão [46].

Algumas bactérias necessitam de iões metálicos para o seu crescimento. A disponibilidade e o tipo de iões (tipo e sua reactividade determinado pelo estado de oxidação do metal) são susceptíveis de ter um efeito sobre a colonização de uma superfície de metal [50].

Assim, a formação de todas estas estruturas celulares pode ser prejudicial para a integridade de certos materiais e conduzir à corrosão destes [49]. A MIC tem-se manifestado em muitas formas de corrosão localizada de aço, sendo um problema sério no ambiente marinho e muitas indústrias, tais como de geração de energia, petroquímica, transportes, engenharia civil, papel e celulose, conduzindo a graves problemas de segurança e preocupações económicas [47, 48, 50].

Apesar de plástico e borracha serem menos propensos à biocorrosão, factores ambientais como a temperatura e a radiação solar podem desencadear um ataque microbiano [19]. Praticamente qualquer tipo de superfície na Terra pode ser colonizado por bactérias, leveduras, vírus ou fungos [19].

Métodos implementados para prevenir biocorrosão devem abordar as seguintes questões fundamentais: inibição do crescimento e / ou actividade metabólica dos microrganismos; modificação do ambiente em que o processo de corrosão ocorre para evitar a adaptação dos microrganismos às condições existentes [47].

Métodos habitualmente empregues para prevenir e controlar a corrosão microbiológica podem ser divididos em várias categorias: (i) procedimentos de limpeza, (ii) biocidas, (iii) os revestimentos, e (iv) protecção catódica [47].

Os biocidas são compostos simples (ou uma mistura de compostos), capazes de matar microrganismos ou inibir o crescimento microbiano [47]. A eficácia de um biocida depende da natureza dos microrganismos a serem eliminados e das condições de funcionamento do sistema a ser tratado [47].

2.9. Análise de Trabalho Similar Desenvolvido

As bactérias magnetotáticas foram primeiramente descritas na obra de Bellini, tendo observado por microscópio, que um determinado grupo de bactérias se orientavam de acordo com o pólo Norte da Terra [8]. Muitas espécies de bactérias magnetotáticas foram descobertas desde então até aos nossos dias [8]. Neste trabalho desenvolvido por Siores, Lamb, Swallow (2008) [8], observou-se que as bactérias eram capazes de orientar, em conformidade com o campo magnético da Terra de Sul para Norte. Este tipo de bactérias em análise apresenta propriedades magnéticas na sua composição e podem sobreviver em regiões onde o oxigénio e os nutrientes existentes não sejam de todo abundantes.

As técnicas de END por Partículas Magnética (PM) têm sido bastante utilizadas ao longo dos anos, para a detectar a presença de defeitos em materiais ferrosos. A presença de uma falha no material provoca uma distorção do fluxo magnético, sendo desta forma possível a detecção da anomalia no material.

A técnica experimental das PM com partículas de dimensões nanométricas, não leva aos melhores resultados, no que diz respeito à detecção de micro-defeitos, o que levou os autores ao desenvolvimento de uma nova técnica para a detecção e avaliação de falhas de tamanho nano.

As partículas magnéticas bacterianas vêm solucionar os problemas com defeitos de dimensões reduzidas, pois estas partículas apresentam diâmetros na faixa dos 50 a 100 nm. As partículas magnéticas bacterianas orientam-se em cadeias ao longo das linhas do campo magnético. Como as bactérias magnetotáticas são os menores micro-organismos vivos conhecidos capazes de usar o campo magnético da Terra a utilização destas permite detectar com uma boa qualidade a existência de defeitos de dimensões reduzidas [8].

Outra vantagem com o uso de nano/micro partículas de bacterianas é a redução na contaminação do material em fase de testes, bem como o contacto humano com estas bactérias não traz efeitos nefastos [8].

3. Abordagem à Técnica Inovadora de END por Filmes de Células Bacterianas

3.1. Introdução

Neste capítulo irá ser feita uma abordagem à técnica inovadora que se pretende desenvolver de END em filmes de células bacterianas. Serão abordadas as possíveis aplicações, as principais etapas desta técnica, encontrando-se também esquematizações que ilustram e ajudam a perceber a metodologia que irá ser aplicada. Por fim, faz-se um breve paralelismo entre a técnica que se pretende desenvolver e os LP.

3.2. Aplicações

Este tipo de END, associados a esta técnica inovadora que se começou a desenvolver, é apenas aplicável a defeitos que se encontrem à superfície da peça a analisar. As técnicas desenvolvidas foram testadas e analisadas para defeitos de dimensões reduzidas, nomeadamente, os micro-defeitos.

São técnicas que podem vir a ter uma ampla gama de materiais a aplicar, pois poderão ser aplicadas em diversos tipos de materiais e ligas, quer estes sejam condutores ou não, tais como, ligas magnéticas, ligas de alumínio, de magnésio, bronzes, polímeros, vidros ou cerâmicos, compósitos, entre outros. Estas técnicas podem ser usadas tanto para defeitos maiores, como para outros de dimensões bem mais pequenas, tais como os micro-defeitos, comuns em certas aplicações e que podem causar grandes problemas nessas mesmas aplicações modernas.

A microfabricação deverá ser uma das grandes aplicações desta técnica de END em filmes de células bacterianas. Devido à dimensão reduzida dos componentes que são fabricados, as técnicas de END convencionais sentem dificuldades na detecção de defeitos presentes nestes micro-componentes. A título de exemplo podem referir-se dois casos e as causas porque estas técnicas de END convencionais falham neste tipo de fabrico. Nos ensaios por Ultra-Sons não é possível o acoplamento entre a sonda e o material, já no caso das Correntes Induzidas, não existe espaço para a circulação das correntes induzidas.

Um exemplo de micro-defeitos e em que a técnica de END em filmes de células bacterianas poderia vir a ser aplicada, acontece nas pás das turbinas dos motores de avião. As turbinas dos motores

que constituem os aviões são compostas por bastantes pás como aquelas que se ilustram na Figura 3.1, estando estas sujeitas a enormes esforços, provocados pelo de fluxo de ar que as pás deslocam, aquando do funcionamento do motor, podendo ao fim de um certo período de tempo, por fadiga, acontecer a fissuração das pás e com isso a necessidade da sua substituição. Estas fissuras são por norma de dimensões reduzidas e quando acontecem podem prejudicar gravemente o desempenho do motor, pelo que são necessárias inspecções periódicas e o uso de técnicas não destrutivas para detectar este tipo de micro-defeitos.

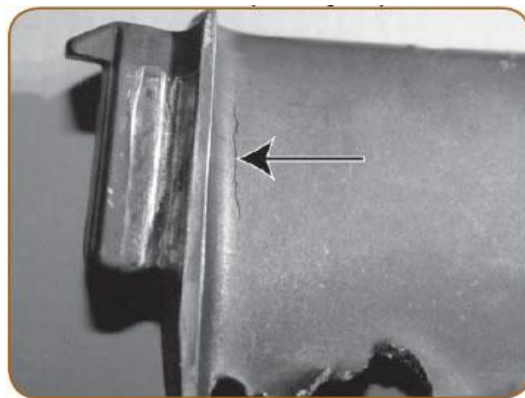


Figura 3.1 – Micro-defeitos em pás de turbinas de avião [51]

3.3. Metodologia de Teste

De acordo com o tipo de bactérias que são usadas, podem ser utilizadas vários tipos de metodologias que diferem apenas nalgumas das etapas, sendo a metodologia mais genérica aquela que se apresenta na Figura 3.2.

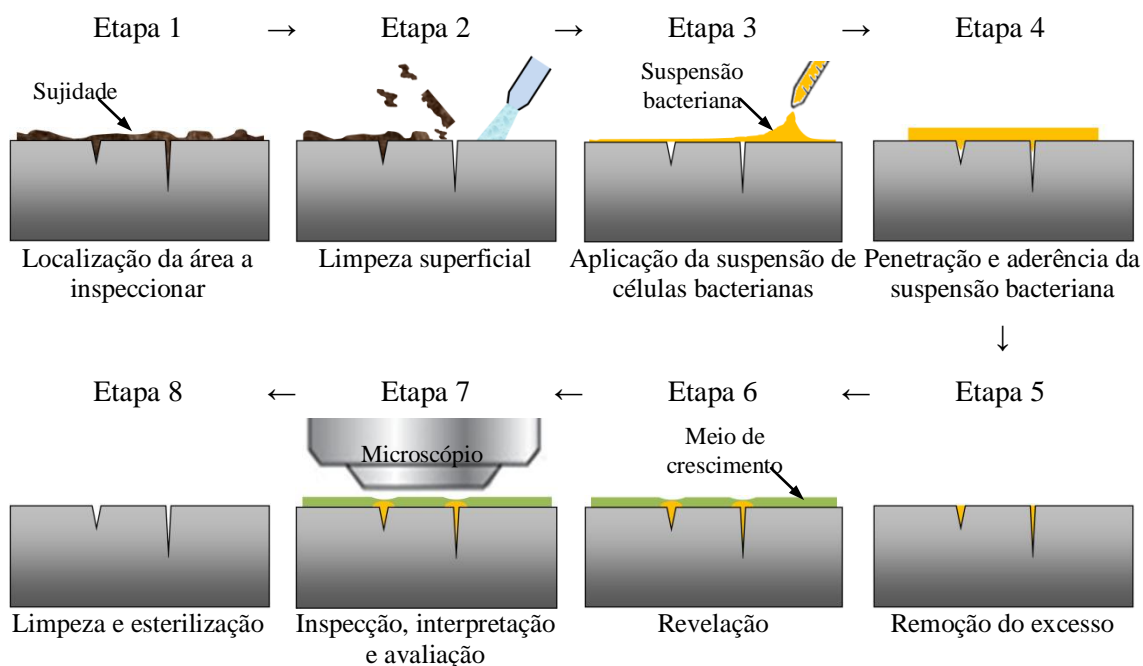


Figura 3.2 – Metodologia genérica de teste

Existem variantes para algumas das etapas apresentadas na Figura 3.2, sendo que as mais significativas são aquelas que acontecem na etapa 4.

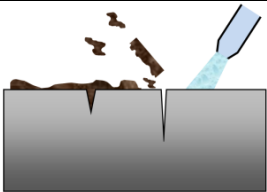
No caso de se utilizarem as propriedades eléctricas ou magnéticas que algumas bactérias possuem, existe a necessidade de introduzir algumas variantes à metodologia que foi apresentada na Figura 3.2. Aproveitando estas propriedades das bactérias e utilizando os equipamentos adequados desenvolveram-se técnicas para promover a movimentação das bactérias e desta forma facilitarem a penetração das bactérias nos defeitos, sendo essas técnicas apresentadas na Etapa 4.

De forma sucinta, apresenta-se de seguida em várias tabelas, as variantes possíveis para cada etapa, assim como um pequeno comentário ao que sucede em cada uma delas.

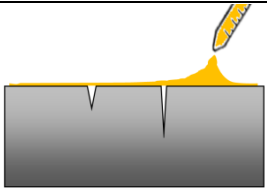
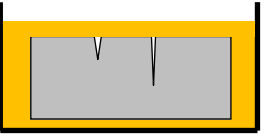
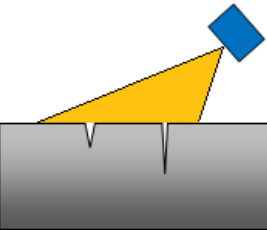
Etapa 1:

Variante		Descrição
1-		Nesta etapa tem-se a localização da área a inspeccionar, sendo nesta fase que se identifica qual o tipo de material que vai analisar, assim como o tipo de sujidade presente, para que assim desta forma se possa escolher qual a melhor técnica a utilizar e quais os produtos que podem ser utilizados para limpar a sujidade existente à superfície do material.


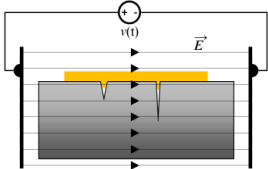
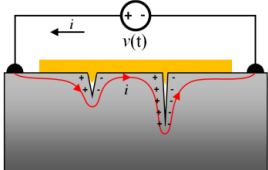
Etapa 2:

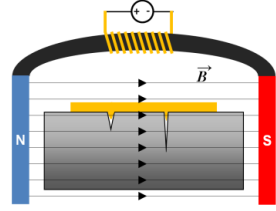
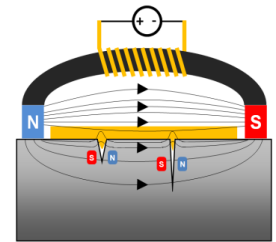
Variante	Descrição
2-	 <p>Após escolher a técnica mais adequada e o produto indicado, pode-se dar início à limpeza superficial da peça a analisar e com isso remover toda a sujidade presente à superfície.</p>

Etapa 3:


Variante	Descrição
3.1- Derrame	 <p>Nesta variante efectua-se a deposição da suspensão bacteriana por derrame desta sobre a peça.</p>
3.2 – Imersão	 <p>Nesta variante coloca-se a peça a analisar dentro de uma tina contendo a suspensão bacteriana.</p>
3.3- Spray	 <p>A aplicação da suspensão das células bacterianas também pode ser feita através da pulverização por spray.</p>

Etapa 4:

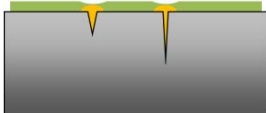

Variante	Descrição	Parâmetros de ensaio
4.1- Para todo o tipo de bactérias	 <p>Nesta variante a penetração da suspensão bacteriana acontece sem qualquer tipo de acção exterior, deixando-se a amostra em repouso após a colocação desta na sua superfície, penetrando as bactérias nos defeitos através da sua dimensão reduzida e das suas propriedades de mobilidade e aderência, sendo neste caso o tempo e a capilaridade factores determinantes.</p>	<p>- T - h</p>
4.2- Para bactérias com propriedades eléctricas	 <p>O campo eléctrico pode ser constante ou alternado com uma frequência que é um parâmetro importante para auxiliar a mobilidade das bactérias. Esta situação aplica-se a componentes de pequena dimensão (até ~60 mm), possíveis de colocar entre as placas electrizadas. Aplica-se a materiais condutores ou não condutores de corrente eléctrica.</p>	<p>- T - f - \vec{E} - \vec{E}</p>
	 <p>A corrente eléctrica pode ser DC ou AC com uma frequência que é um parâmetro importante para auxiliar a mobilidade das bactérias. Esta situação aplica-se a componentes que podem ter maior dimensão mas têm de ser condutores de corrente eléctrica.</p> <p>(Nota: Este procedimento também pode ser testado com as bactérias magnéticas, porque as correntes eléctricas que circulam no material produzem campos magnéticos (lei de Biot-Savart) que podem atrair as bactérias para as zonas dos defeitos onde a corrente é perturbada)</p>	<p>- T - f - \vec{i}</p>

4.3- Para bactérias com propriedades magnéticas		O campo magnético pode ser constante (Ímã permanente) ou alternado (solenóide com núcleo de ferrite).	Colocar o componente no interior de um entre ferro com um campo magnético uniforme.	- T - f - $ \vec{B} $ - \vec{B}
		Pode ser aplicado em materiais ferromagnéticos e não ferromagnéticos	Colocar o campo B sobre a amostra.	- T - f - $ \vec{B} $

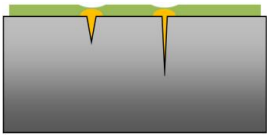
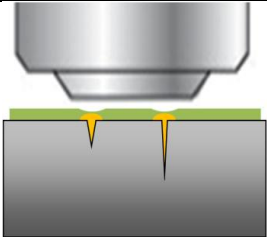
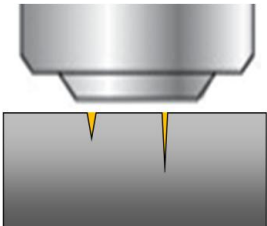
Etapa 5:

Variante		Descrição
5-		Procede-se à remoção do excesso de fluido bacteriano que se encontra à superfície da amostra. Esta pode ser feita de várias maneiras, podendo por exemplo ser efectuada com um esguicho com água, pela passagem de um papel ou até pela utilização de uma luz ultravioleta.


Etapa 6:

Variante		Descrição
6.1- Revelação		Colocando as amostras num meio de cultura adequado, dá-se o crescimento de colónias de bactérias em torno dos defeitos existentes, pois as bactérias vão-se alimentando e reproduzindo, evidenciando desta forma os defeitos existentes.
6.2- Sem revelação		A etapa de revelação pode não ser realizada, saltando-se directamente para a Etapa 7

Etapa 7:

Variante		Descrição
7.1- Olho nu		A inspecção pode ser feita a olho nu no caso de se ter efectuado revelação e que essa revelação tenha produzido colónias de bactérias em quantidade suficiente para que estas sejam facilmente visíveis.
7.2- Amostra com revelação e inspecção ao microscópio		No caso de se ter efectuado a revelação e se pretenda uma análise mais pormenorizada dos resultados é conveniente a utilização do microscópio.
7.2- Amostra sem revelação e inspecção ao microscópio		No caso de não ter sido efectuada a revelação, é necessária a utilização do microscópio para a inspecção, interpretação e avaliação dos resultados.

Etapa 8:

Variante		Descrição
8-		Nesta etapa pretende-se remover das amostras ensaiadas, todos os fluidos e bactérias que foram utilizadas durante a realização do ensaio. Pode usar-se um bactericida ou utilizar temperaturas da ordem dos 60°C para matar as bactérias.

Pela observação das várias variantes principais para cada uma das etapas, verifica-se que existe uma enormidade de experimentações possíveis a realizar, pelo que só pelos parâmetros principais identificados para as várias etapas podemos ter o seguinte número de possibilidades: $1 \times 1 \times 3 \times 2 \times 4 \times 3 \times 4 \times 3 \times 1 \times 2 \times 3 \times 1 = 5184$ hipóteses.

Apresenta-se na Figura 3.3 um organograma com as principais etapas a realizar nos ensaios, no qual se encontram de forma resumida as principais ideias de cada uma dessas etapas.

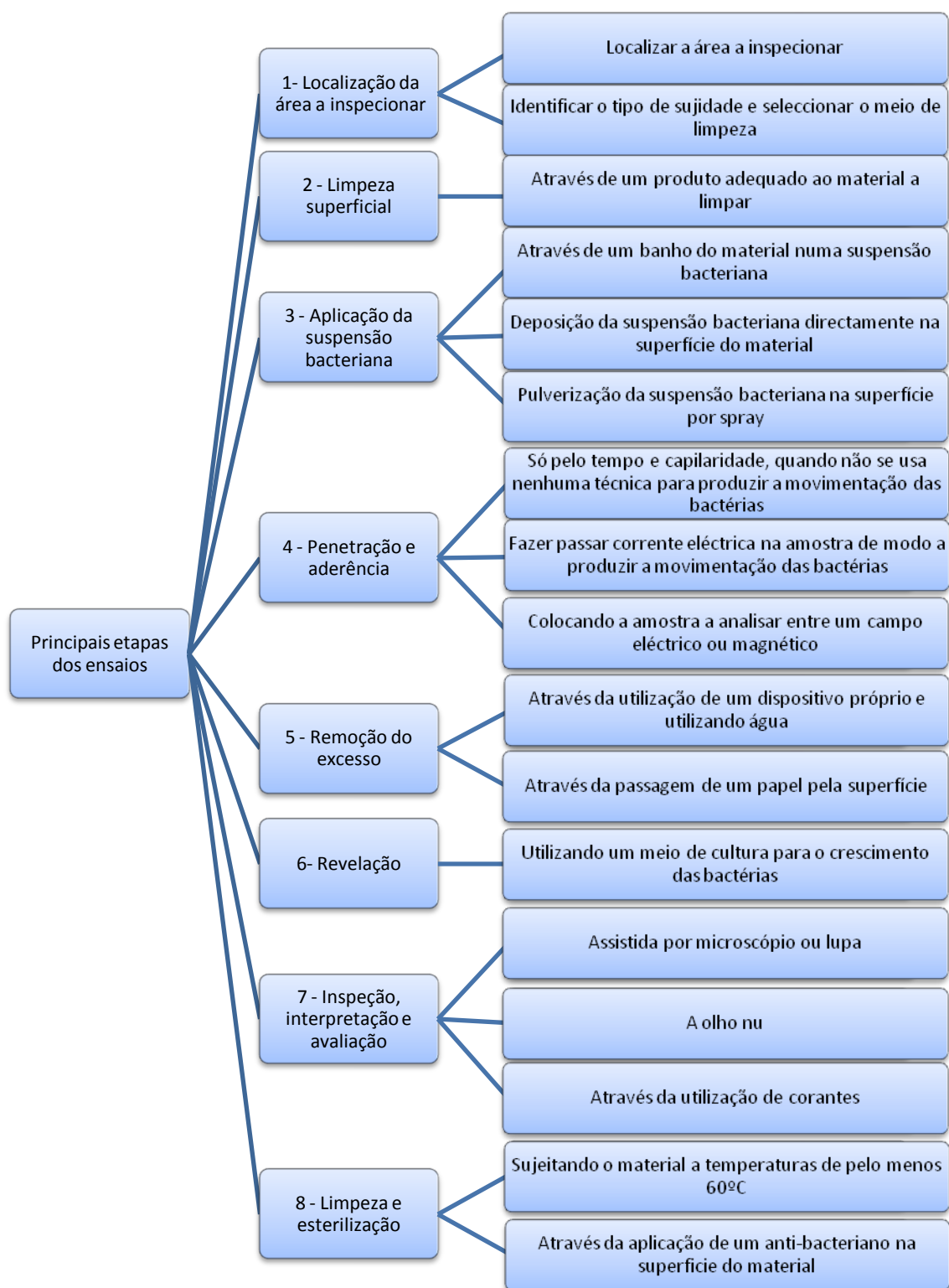


Figura 3.3 – Principais etapas dos ensaios a efectuar

3.4. Paralelismo Entre Líquidos Penetrantes e Técnica a Desenvolver

Pode-se facilmente encontrar algum paralelismo entre a técnica de líquidos penetrantes e a técnica que será desenvolvida baseada em filme de células bacterianas.

A começar pode-se verificar que os materiais a aplicar são sensivelmente os mesmos para as duas técnicas de ensaios não destrutivos, não podendo estas ser aplicadas em materiais porosos.

Verifica-se também que existem várias etapas coincidentes durante o processo de aplicação destas duas técnicas. Ambas necessitam na fase inicial de uma limpeza superficial das peças a serem analisadas por forma a remover possíveis impurezas, óxidos, sujidades e resíduos que possam existir à superfície. Numa outra fase, após a aplicação do líquido penetrante é necessário esperar algum tempo de modo a que o líquido penetre nas fissuras existentes. Passado esse tempo de penetração, deve-se remover em ambas as técnicas o excesso de penetrante existente à superfície. Já no que diz respeito ao revelador, a técnica convencional de LP utiliza por norma a aplicação de um pó de cor branca, de modo a que seja possível detectar os defeitos. Na técnica que se pretende desenvolver de filmes de células bacterianas podem utilizar-se corantes para destacar as bactérias ou também a colocação destas num meio de cultura de modo a promover o crescimento de colónias de bactérias. Na técnica convencional dos líquidos penetrantes a inspeção é feita a olho nu, enquanto que na técnica de filmes de células bacterianas pode utilizar-se também o microscópio ou uma lupa para auxiliar na inspeção. Por fim em ambas as técnicas deve limpar-se a superfície de modo a remover os resíduos ainda existentes dos produtos utilizados nestas técnicas de ensaios não destrutivos.

Em suma pode quase dizer-se que esta técnica inovadora de END em filmes de células bacterianas pode ser considerada como uma derivação das técnicas convencionais dos LP.

A técnica de END em filmes de células bacterianas é no entanto uma técnica que pode ser mais adequada para micro-defeitos e mais ligada à microfabricação, pois as propriedades microscópicas das bactérias poderão permitir com que estas se possam infiltrar em defeitos de dimensões mais reduzidas que as técnicas convencionais de LP.

4. Desenvolvimento e Produção de Defeitos Padrão

4.1. Introdução

Neste capítulo será abordado o desenvolvimento das matrizes de defeito assim como a posterior produção destas em diferentes materiais, com propriedades distintas. Estes defeitos foram produzidos por um micro durómetro, utilizando diferentes cargas para produzir indentações de forma piramidal com tamanhos distintos, apresentando-se ao longo deste capítulo várias imagens relativas a estas matrizes.

4.2. Desenvolvimento das Matrizes de Defeitos Padrão

Para que se consiga detectar de forma eficaz e confiável o limiar de detectabilidade dos defeitos que esta técnica de END permite detectar, bem como o tipo de defeitos a que mais se adequa, mas também de forma a observar o comportamento das bactérias nos diversos tipos de defeitos em análise, importa produzir diversos tipos de matrizes, que combinem as posições dos defeitos de forma variada. A existência do mesmo defeito em várias posições da matriz é algo bastante importante, visto que, em caso da não existência de uniformidade na disposição das bactérias numa determinada zona da superfície da amostra, certamente noutra zona da matriz isso não se verifica. É também importante que o mesmo defeito se encontre em diversas posições da amostra, em virtude da dificuldade que existe em se obter peças perfeitamente polidas e assim, caso o defeito produzido se encontre junto a uma zona menos bem polida, certamente noutra zona esse mesmo poderá ficar numa zona mais perfeita da superfície da amostra, conseguindo desta forma eliminar a possível interferência que riscos e outros tipos de defeitos ainda existentes à superfície tenham nas experimentações desenvolvidas.

Assim foram desenvolvidas de forma a serem utilizadas nos ensaios práticos para o desenvolvimento desta técnica de END, quatro tipos de matrizes diferentes, em que os defeitos existentes estarão sempre separados de 300 μm uns dos outros. Essas matrizes contêm defeitos de oito tamanhos diferentes, sendo estes produzidos por um micro-durómetro, que possui diferentes cargas de indentação, indicadas na Tabela 4.1, tendo cada indentação produzida a duração de 10 segundos. O micro-durómetro é um aparelho utilizado para medir a dureza dos materiais, no entanto neste caso, utilizaram-se as diversas cargas do aparelho para produzir defeitos de várias dimensões, que se encontravam organizados nas matrizes de defeito.

Tabela 4.1 - Tipos de cargas utilizadas para produzir as matrizes de defeitos.

Defeito	A	B	C	D	E	F	G	H
Carga do micro-durómetro (kg)	1	0.5	0.3	0.2	0.1	0.05	0.025	0.01

Na Figura 4.1 apresenta-se uma das matrizes de defeitos padrão produzidas, em que neste caso se alterna de linha para linha a ordem dos defeitos, tendo-se na primeira a apresentação dos defeitos por ordem decrescente da sua dimensão e vindo na segunda linha a apresentação dos defeitos por ordem crescente. Nas linhas três e quatro repete-se simplesmente a ordem das duas primeiras linhas. Devido à forma alternada como as linhas desta matriz se apresentam, denominou-se esta de matriz alternada.

A	B	C	D	E	F	G	H
H	G	F	E	D	C	B	A
A	B	C	D	E	F	G	H
H	G	F	E	D	C	B	A

Figura 4.1 – Representação esquemática dos defeitos padrão da matriz alternada

Na Figura 4.2 observa-se uma matriz em que de linha para linha se verifica a repetição de uma mesma lógica. Os sete primeiros elementos de cada linha avançam uma posição na linha seguinte, sendo que o ultimo elemento da linha inicial passa a ser o primeiro elemento da linha seguinte. Assim obtém-se uma matriz com todas as diagonais compostas sempre pelos mesmos elementos, pelo que se denominou esta de matriz diagonal.

A	B	C	D	E	F	G	H
H	A	B	C	D	E	F	G
G	H	A	B	C	D	E	F
F	G	H	A	B	C	D	E
E	F	G	H	A	B	C	D
D	E	F	G	H	A	B	C
C	D	E	F	G	H	A	B
B	C	D	E	F	G	H	A

Figura 4.2 – Representação esquemática dos defeitos padrão da matriz diagonal

Outra das matrizes de defeitos padrão efectuada para aplicar nos materiais a experimentar, apresenta-se na Figura 4.3. Nesta matriz procurou encontrar-se uma forma de combinar os diversos defeitos para que estes pudessem estar presentes em várias posições distintas das linhas da matriz e que pudessem também ter por perto, pelo menos uma vez, cada um dos diferentes defeitos existentes. Assim, devido à forma algo aleatória com que os defeitos vão aparecendo na matriz, decidiu-se apelidar esta de matriz aleatória.

A	B	C	D	E	F	G	H
C	D	A	B	G	H	E	F
B	G	H	E	F	C	D	A
H	E	G	B	D	A	F	C
B	D	A	F	C	H	E	G
A	F	B	D	E	G	C	H
D	E	G	C	H	A	F	B
G	C	D	E	F	B	H	A

Figura 4.3 – Representação esquemática dos defeitos padrão da matriz aleatória

De modo a que todos os defeitos de uma matriz possam ser observados na ampliação do microscópio existente, criou-se uma matriz de dimensão mais reduzida com três linhas e quatro colunas, contendo assim doze indentações. Devido a ser uma matriz bastante mais pequena que as anteriores, denominou-se esta de matriz reduzida e encontra-se representada na Figura 4.4.

A	B	C	D
H	G	F	E
E	F	G	H

Figura 4.4 – Representação esquemática dos defeitos padrão da matriz reduzida

4.3. Produção dos Defeitos

Após a fase em que se desenvolveram os tipos de defeitos artificiais a produzir, bem como as técnicas para os produzir, passou-se à fase de os produzir em materiais distintos, com características diferentes, seleccionados de acordo com as propriedades que os caracterizam. Assim foram escolhidos uma amostra de cobre, de alumínio, de aço e um polimérico PMMA que se podem observar na Figura 4.5.

O PMMA é um material polimérico transparente relativamente rígido e resistente que apresenta como principais vantagens para aplicações em engenharia, a sua baixa densidade, uma boa resistência à corrosão, assim como também são bons isoladores eléctricos. No que diz respeito a desvantagens, estes apresentam uma baixa resistência à tracção e apresentam uma temperatura de utilização relativamente baixa quando comparada com outros materiais [52]. É um material que não é atraído nem repellido por imans, nem é um material magnetizável.

Os aços são ligas ferrosas, sendo dos materiais mais utilizados na indústria, devido ao seu baixo custo, mas também pela sua vasta gama de propriedades mecânicas [52]. Apresenta uma boa condutividade eléctrica, sendo parte das ligas de aço ferromagnéticas, ou seja, são fortemente atraídas por imans.

As ligas de alumínio são as ligas não ferrosas mais importantes, pois apresentam uma boa leveza, deformabilidade, resistência à corrosão e um custo relativamente baixo [52]. O alumínio é um material que apresenta uma boa condutividade eléctrica [52]. Relativamente às suas características magnéticas, este pode ser incluído nos materiais paramagnéticos, ou seja, apresenta uma pequena susceptibilidade magnética positiva na presença de um campo magnético, sendo que o efeito paramagnético desaparece quando se remove o campo magnético [52].

O cobre é um material muito utilizado por ter elevada condutividade eléctrica, resistência à corrosão e custo relativamente baixo [52]. É um material diamagnético, logo possui uma fraca susceptibilidade magnética, ou seja, é ligeiramente repellido por forças magnéticas [52].

Assim foram escolhidos estes materiais por todos apresentarem propriedades diferentes, visto que temos materiais ferrosos e não ferrosos, condutores e não condutores, magnéticos e não magnéticos, entre outras propriedades. Estes quatro materiais diferentes escolhidos, são representativos de um leque alargado de materiais usados em muitas das aplicações industriais. Tipos de materiais diferentes também permitem testar o comportamento das bactérias em diferentes condições, assim como possibilita a obtenção de defeitos produzidos no micro durómetro com diferentes dimensões para as mesmas cargas aplicadas.

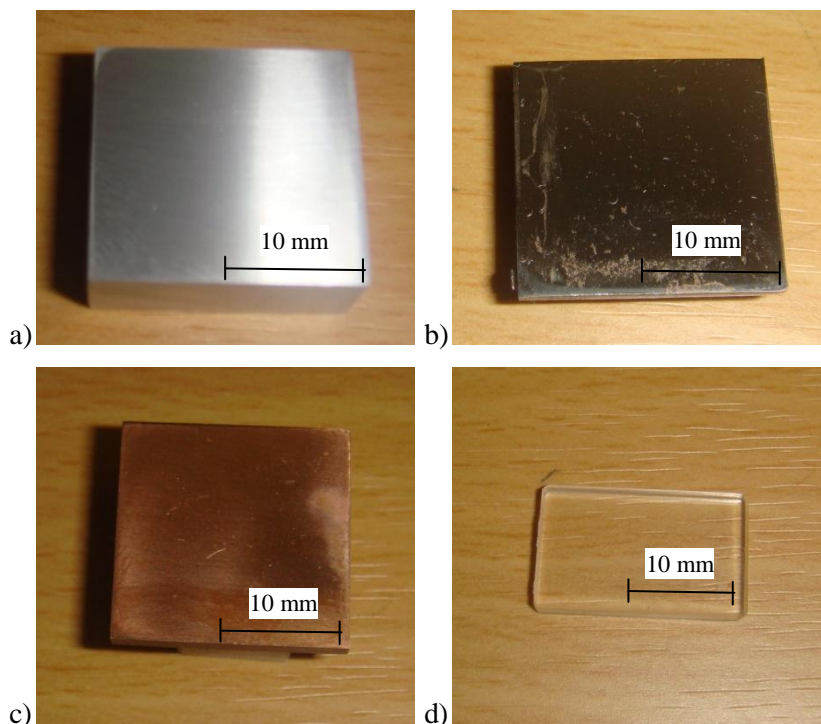


Figura 4.5 – Pedacos de material a utilizar para a produção das amostras de: a) Alumínio, b) Aço, c) Cobre, d) PMMA

As amostras de cobre, alumínio e aço utilizadas, foram recortadas de chapas, possuindo as suas faces maiores forma quadrangular de lado 20 mm. Já no caso da amostra de PMMA, as faces maiores possuem forma rectangular, apresentando 13 mm de largura e 20 mm de comprimento.

Procedendo às indentações no micro durómetro, reproduziram-se as várias matrizes de defeitos padrão nas amostras de cobre, aço, alumínio e PMMA, podendo-se visualizar essas matrizes nas Figuras 4.6, 4.7, 4.8, 4.9 e 4.10.

Em virtude de os materiais possuírem diferentes durezas, obtiveram-se diferentes comprimentos para as diagonais das pirâmides nas diversas amostras, para os mesmos valores de carga de indentação. Assim obtiveram-se as diagonais maiores para o caso da amostra de material polimérico PMMA em virtude de este ser o mais macio de todos e as diagonais mais pequenas obtiveram-se na amostra de aço, por este ser o material mais duro utilizado. Na Tabela 4.2 apresentam-se os valores médios adquiridos para as diagonais de cada uma das indentações produzidas, nos quatro materiais diferentes ensaiados.

Tabela 4.2 – Dimensão das diagonais de cada indentação

Número do defeito	Tipo de defeito	Dimensão do defeito (μm)			
		Aço	Cobre	PMMA	Alumínio
1º	A	136,5	146,9	295,9	178,2
2º	B	97,4	104,7	212,5	130,8
3º	C	73,5	81,1	166,8	100,6
4º	D	59,3	66,6	135,6	80,4
5º	E	41,4	47,3	98,0	55,3
6º	F	28,4	34,8	69,1	39,9
7º	G	20,3	24,5	48,2	30,1
8º	H	12,3	13,7	30,0	18,0

De seguida, nas Figuras 4.6, 4.7, 4.8 e 4.9 apresenta-se imagens ao microscópio das matrizes diagonal, aleatória, alternada e reduzida para as várias amostras produzidas. Estas imagens foram obtidas através de uma câmara adaptada ao microscópio, sendo que nas Figuras 4.6 e 4.7 não aparece a última linha da matriz diagonal e da matriz aleatória, em virtude de, mesmo na lente de menor ampliação, ser de todo impossível captar as oito linhas que compõem a matriz.

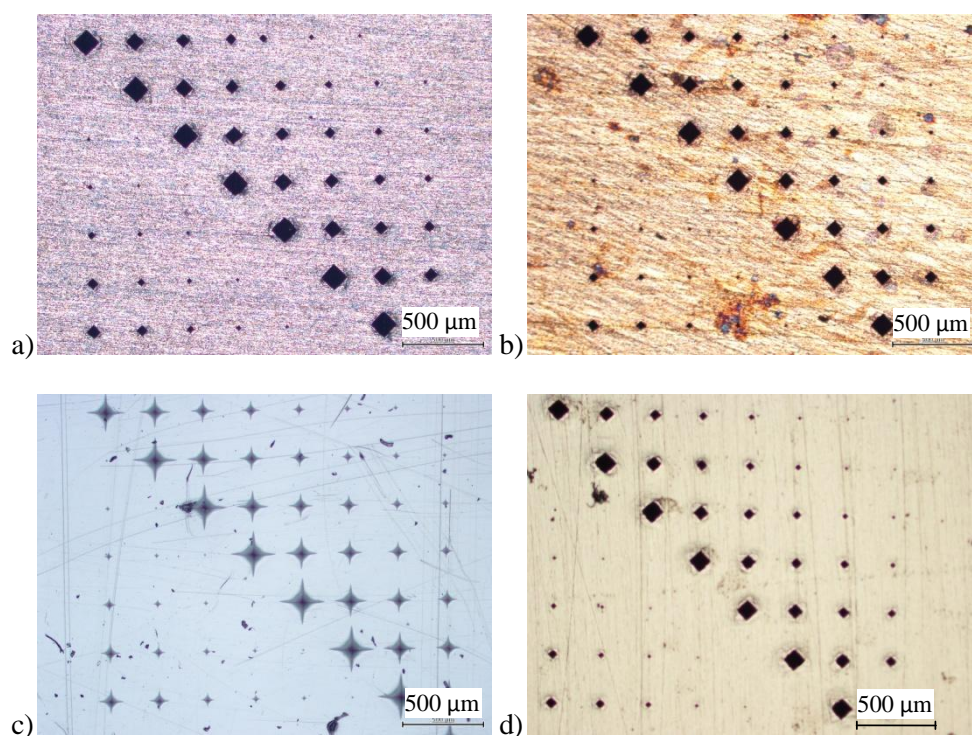


Figura 4.6 – Matriz diagonal produzida nos diversos tipos de materiais utilizados: a) Alumínio, b) Cobre, c) PMMA, d) Aço

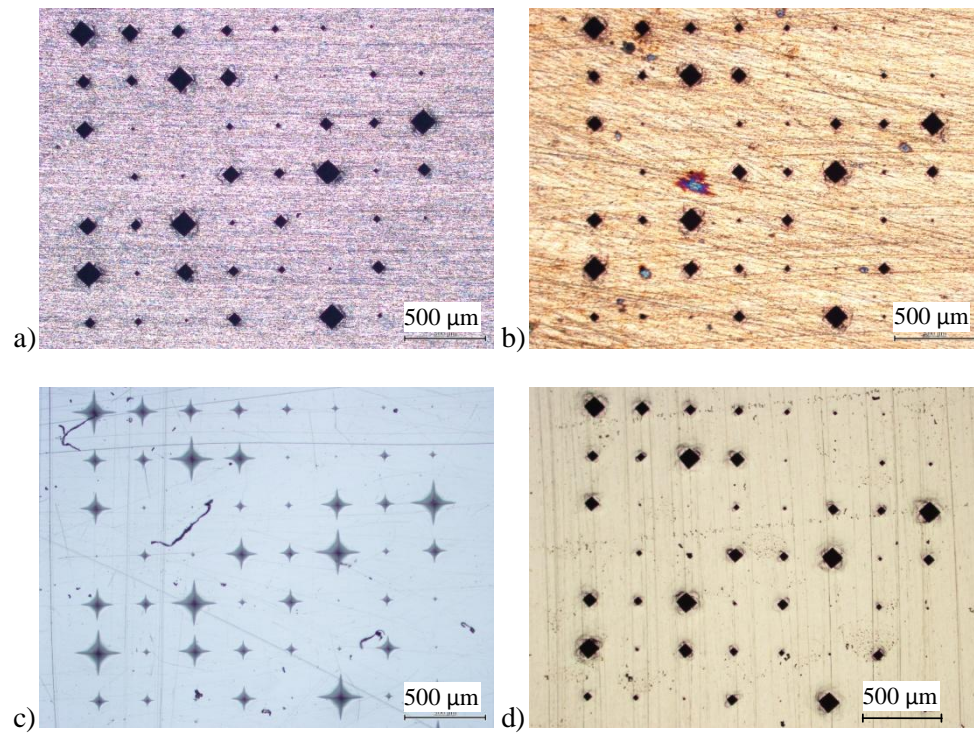


Figura 4.7 – Matriz aleatória produzida nos diversos tipos de materiais utilizados: a) Alumínio, b) Cobre, c) PMMA, d) Aço

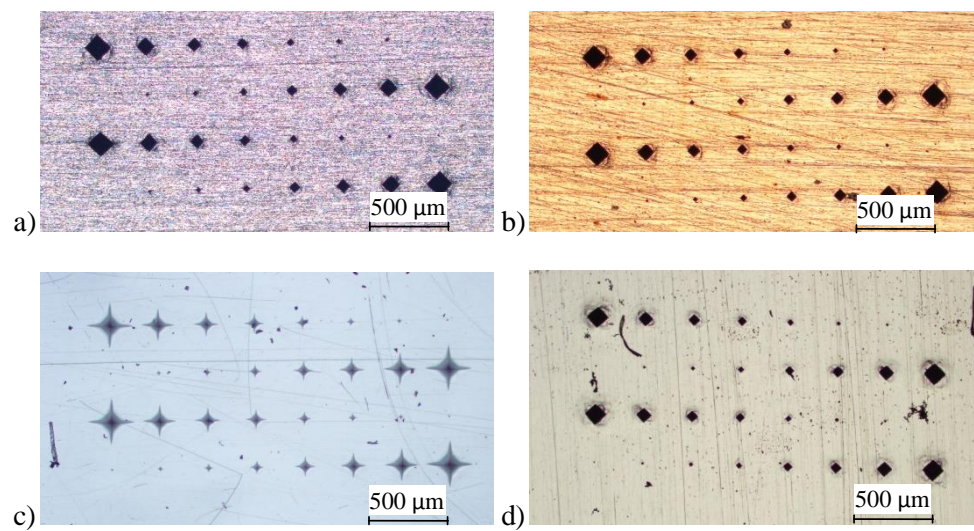


Figura 4.8 – Matriz alternada produzida nos diversos tipos de materiais utilizados: a) Alumínio, b) Cobre, c) PMMA, d) Aço

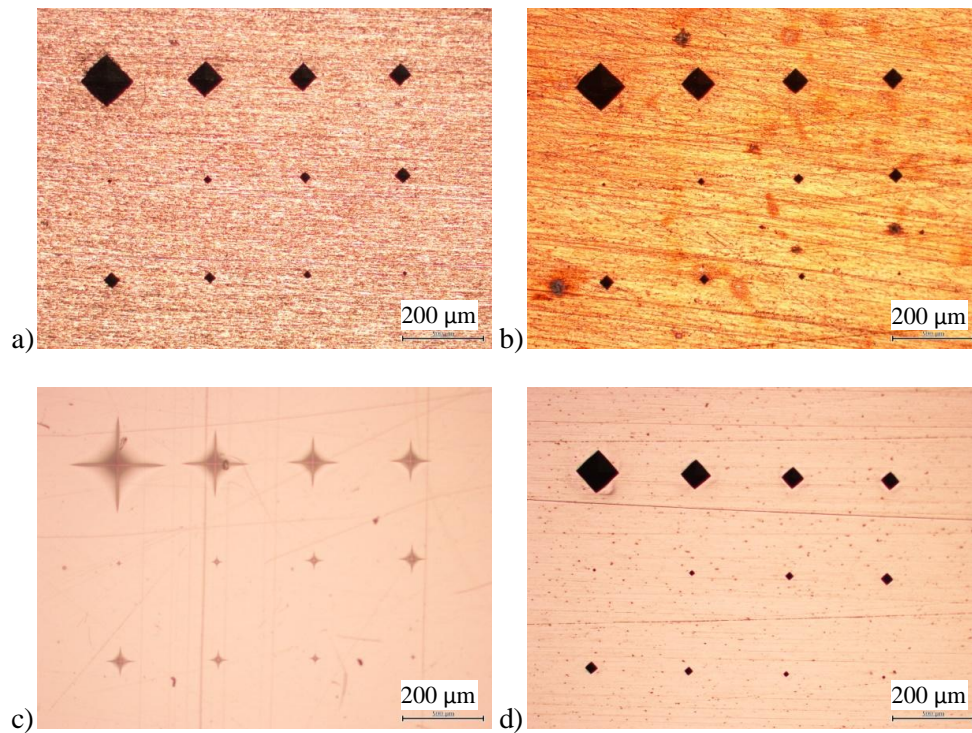


Figura 4.9 – Matriz reduzida produzida nos diversos tipos de materiais utilizados: a) Alumínio, b) Cobre, c) PMMA, d) Aço

Na Figura 4.10 tem-se duas imagens, tendo sido estas obtidas por digitalização num scanner de alta resolução. Colocaram-se estas imagens digitalizadas, pois só assim era possível visualizar todas as linhas que compunham a matriz diagonal e aleatória, já que no microscópio, mesmo com a lente de menor ampliação, apenas se conseguiam visualizar no máximo sete linhas da matriz.

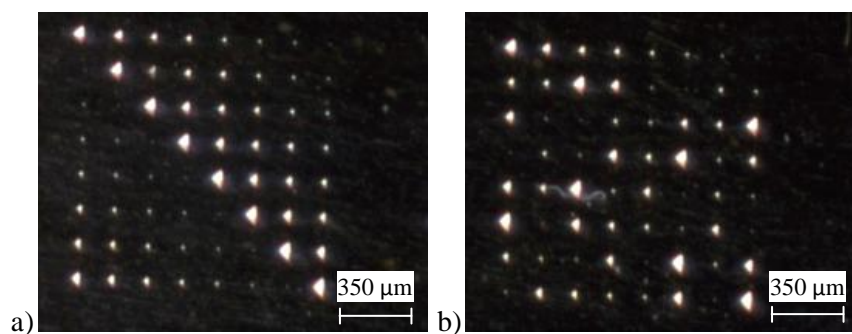


Figura 4.10 – Matrizes de defeito: a) matriz diagonal, b) matriz aleatória

5. Desenvolvimento de Meios Laboratoriais Para Aplicação das Metodologias de Teste

5.1. Introdução

Para os vários ensaios realizados foi necessário desenvolver um conjunto de equipamentos e respectivas peças de modo a que fosse possível estudar o comportamento das bactérias e testar as metodologias desenvolvidas para esta técnica de END, nomeadamente as variantes que envolvem bactérias com propriedades eléctricas e magnéticas.

As várias peças construídas foram processadas através de diversas operações de maquinagem como por exemplo: corte por serra, corte na máquina de precisão, furos no engenho de furar, operações de fresagem e torneamento, entre outras.

Todas as peças produzidas foram sujeitas a um pequeno polimento, de modo a melhorar o seu aspecto visual.

5.2. Desenvolvimento e Produção de Componentes para Adaptação à Base do Microscópio

Devido ao facto de se estar a trabalhar com bactérias e de estas apresentarem uma dimensão muito reduzida, levou a que fosse necessário efectuar as diversas experimentações no microscópio, com vista a que seja possível acompanhar e analisar o comportamento das bactérias ao longo destas mesmas experimentações a que são sujeitas.

Assim foi necessário desenvolver uma nova base para fixar à base já existente no microscópio, bem como o desenvolvimento de diversos tipos de componentes essenciais para que fosse possível adaptar ao microscópio os geradores de campos magnéticos e de campo eléctrico para a realização dos ensaios necessários ao desenvolvimento desta nova técnica de END.

Apresentam-se, na Figura 5.1 fotografias das várias montagens com todas as peças produzidas. Assim, na Figura 5.1 a) representa-se em simultâneo os três solenoides geradores de campos magnéticos montados na base a adaptar ao microscópio, podendo ter-se em simultâneo ou de modo intercalado um campo magnético horizontal com um campo magnético vertical. Na Figura 5.1 b) representa-se apenas a montagem na base a adaptar ao microscópio dos dois solenoides, geradores de

campos magnéticos horizontais. Já na Figura 5.1 c) apresenta-se outra das configurações possíveis, em que se pode intercalar um campo magnético vertical produzido pelo solenoide vertical com um campo eléctrico horizontal produzido pelas placas de campo eléctrico. Na Figura 5.1 d) observa-se a montagem do solenoide vertical, capaz de gerar campos magnéticos verticais.

Os solenoides geradores de campos magnéticos horizontais podem variar a sua posição segundo a horizontal, apresentando cada garfo do conjunto um curso de 14 mm. Na Figura 5.2 pode observar-se as distâncias máximas e mínimas a que as extremidades dos varões de aço condutores de campos magnéticos podem ficar, com a movimentação promovida pelo deslocamento dos garfos.

As placas de campo eléctrico também podem mover-se segundo a horizontal, permitindo desta forma aproximar ou afastar as placas consoante o tamanho da amostra que se esteja a analisar. Na Figura 5.3 podem observar-se as distâncias máximas e mínimas a que as placas de campo eléctrico podem ficar uma da outra, com a movimentação promovida pelos rasgos efectuados.

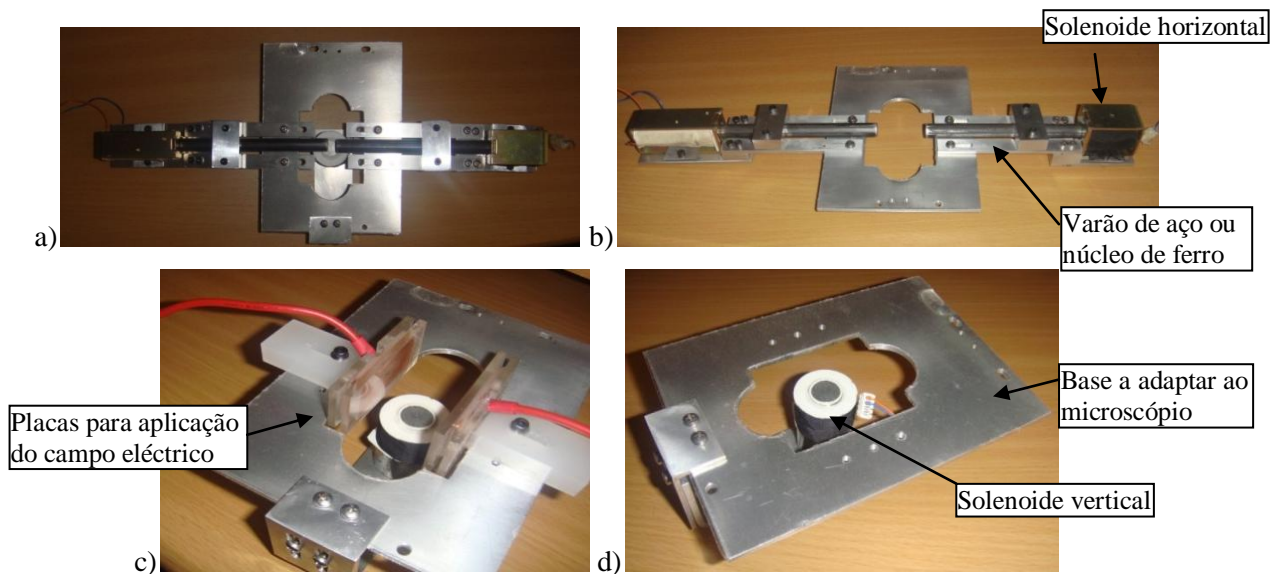


Figura 5.1 – Vários tipos de montagens dos componentes produzidos: a) Montagem com os campos magnéticos horizontais e verticais, b) Montagem com os campos magnéticos horizontais, c) Montagem com o campo magnético vertical e as placas de campo eléctrico, d) Montagem com o campo magnético vertical

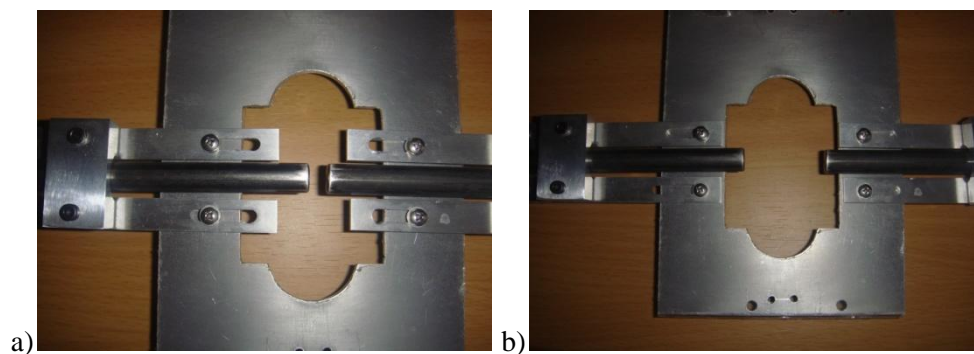


Figura 5.2 – Distâncias máxima e mínima a que os varões de aço podem ficar: a) Distância mínima – 6 mm, b) Distância máxima – 34 mm

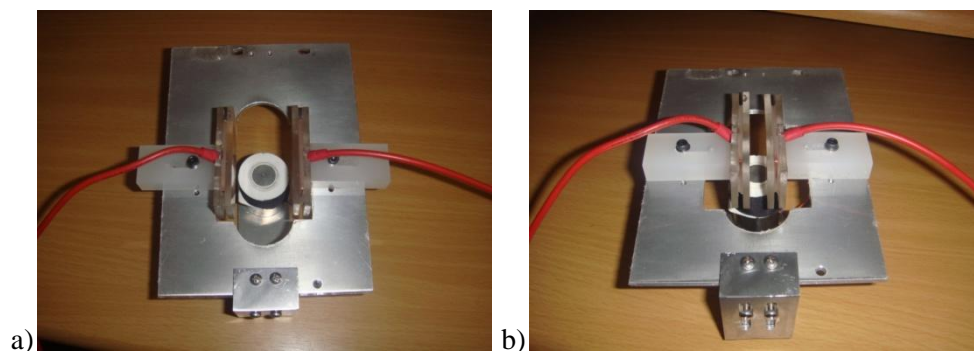


Figura 5.3 – Distância máxima e mínima das placas de campo eléctrico: a) Placas à distância máxima – 6 mm, b) Placas à distância mínima – 30 mm

No Anexo A1 apresentam-se as folhas de desenho do SolidWorks para os principais componentes das montagens efectuadas na Figura 5.1.

5.3. Desenvolvimento e Produção de Placas de Campo Eléctrico Capazes de Gerar um Campo Mais Homogéneo

Com o intuito de se obter um campo eléctrico mais uniforme no espaçamento entre as placas, decidiu-se produzir um sistema de placas eléctricas que apresentam maiores dimensões. Este novo equipamento também permite que se possam utilizar campos eléctricos horizontais ou verticais, consoante o posicionamento em que se coloca o dispositivo. A esta estrutura construída incorporou-se um cabo para ligar à terra de modo a garantir maior segurança durante os ensaios, tendo em conta o elevado potencial que se pretende utilizar (até 10 KV).

Para fixar as placas de campo eléctrico, desenvolveu-se uma estrutura composta por três troços de perfil Bosh. Esta estrutura possui esta forma de tripé, de modo a que seja possível utilizar as placas de campo eléctrico na horizontal ou na vertical, conforme se pretenda obter um campo eléctrico vertical ou horizontal respectivamente, bastando para isso fazer uma rotação de 90° de um dos troços do perfil Bosh, facto que é observável na Figura 5.4.

As placas de campo eléctrico apresentam uma área cerca de duas vezes superior que as placas de campo eléctrico produzidas para adaptar ao microscópio.

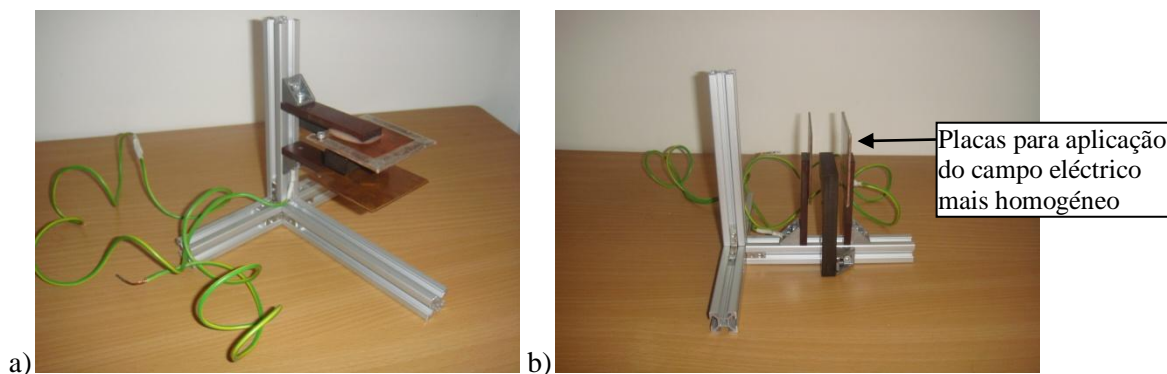


Figura 5.4 – Estrutura de perfil Bosh com as placas de campo eléctrico na: a) horizontal; b) vertical

No Anexo A2 encontram-se presentes várias folhas de desenho em SolidWorks para os principais componentes da estrutura de perfil Bosh com as placas de campo eléctrico.

A utilização do perfil Bosh possui grandes vantagens para a construção de estruturas como aquela que se produziu para adaptar as placas de campo eléctrico. Este perfil para além de económico, é bastante fácil de usar para construir estruturas, bastando apenas ligações aparafusadas para unir os vários troços de perfil, o que significa que também se consegue ter uma montagem bastante rápida. Além disso, este alumínio possui um bom acabamento superficial e esteticamente agradável e todos os componentes utilizados na estrutura podem ser infinitamente reutilizados, sem que haja degradação dos mesmos.

Entre as placas de campo eléctrico verifica-se a existência de uma peça que serve de base para as amostras quando as placas de campo eléctrico se encontram colocadas na vertical. A base foi projectada de modo a que as amostras fiquem sensivelmente a meio das placas de campo eléctrico e desta forma consigam apanhar a zona onde o campo eléctrico é mais uniforme.

5.4. Desenvolvimento e Produção de Componentes Para a Fase de Remoção do Excesso da Etapa 5

O sistema que se encontra representado na Figura 5.5 foi desenvolvido com o intuito de limpar a superfície das amostras em análise, ou seja, remover o excesso de suspensão bacteriana que se encontrava à superfície após o período de penetração e aderência.

A etapa de limpeza foi considerada como um dos parâmetros críticos dos ensaios realizados, sentindo-se por isso a necessidade de construir um sistema que permitisse que em todos os ensaios, a força aplicada para retirar a suspensão em excesso fosse igual. Assim, quando a limpeza era efectuada

através de água, havia a necessidade de se garantir que o volume de água era sempre o mesmo, assim como a força com que este atingia a amostra deveria também ser constante.

Para se proceder à limpeza, colocava-se inicialmente a amostra no fixador de amostras, com o ângulo pretendido. De seguida depositava-se água até encher o reservatório de água, tapando-se de seguida a parte superior deste com o dedo para que a água não se entornasse logo para cima da amostra. Por fim destapava-se o reservatório e tinha-se a descarga de água sobre a amostra de modo a remover o excesso de suspensão bacteriana à superfície.

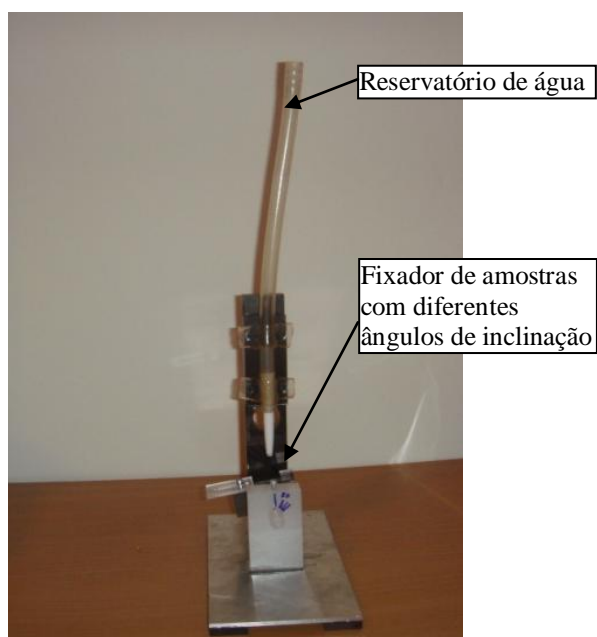


Figura 5.5 – Sistema produzido para a remoção do excesso de suspensão bacteriana à superfície

Este sistema desenvolvido também permite fixar a amostra com vários ângulos de inclinação e deste modo possibilita que se analise qual o melhor ângulo a que deve estar a amostra de modo a que a limpeza superficial seja boa e ao mesmo tempo, que sejam poucas as bactérias removidas do interior dos defeitos.

No Anexo A3 apresentam-se as folhas de desenho do SolidWorks para os principais componentes do sistema de remoção de excesso de suspensão bacteriana produzido.

6. Ensaios Laboratoriais

6.1. Introdução

De modo a desenvolver esta nova técnica de END, foi necessário proceder a uma série de ensaios laboratoriais com vista a procurar os melhores parâmetros a utilizar e ainda eliminar alguns parâmetros que conduzam a resultados menos interessantes. Como esta técnica é inovadora, torna-se necessário andar a experimentar as variadíssimas opções existentes nesta fase inicial.

Para estes ensaios foi utilizada uma suspensão de bactérias de *Rhodococcus erythropolis* DCL14. As células de *R. erythropolis* DCL14 foram crescidas em meio mineral com 0.25% (v/v) de fonte de carbono (etanol absoluto ou *n*-hexadecano) em erlenmeyers de 500 mL num incubador orbital agitorb 200 da Aralab (Portugal) a 200 rpm e 28°C durante 12h.

Estas bactérias podem apresentar carga superficial negativa ou positiva consoante a fonte de carbono utilizada no seu crescimento. As células bacterianas crescem rapidamente com o etanol e adquirem carga superficial negativa [53]. No entanto quando as células são colocadas a crescer em *n*-hexadecano, e como forma de adaptação, acabam por crescer em agregados (por isso forma uma “pasta”) e mudam o potencial zeta (que é o indicador da carga eléctrica superficial que as células bacterianas adquirem quando estas são colocadas no meio mineral), ficando estas com carga superficial positiva [53]. Na Figura 6.1 é possível visualizar os dois tipos de suspensões utilizadas, sendo que o frasco da esquerda contém as bactérias carregadas negativamente e o frasco da direita contém as bactérias carregadas positivamente.



Figura 6.1 – Suspensões de bactérias utilizadas nos ensaios

Todos os ensaios realizados têm de ter uma curta duração, no máximo cerca de 10 minutos, pois passado este período de tempo as bactérias começam a aderir de forma irreversível à superfície em que se encontram, tornando-se depois desse período difícil a sua remoção da superfície do material em análise.

As amostras foram observadas por microscopia de fluorescência usando um microscópio Olympus CX40, com uma unidade Olympys U-RFL-T e com os seguintes filtros em cubo: U-MWB com filtro de excitação BP450-480, filtro de barreira BA515; e U-MWU com filtro de excitação BP330-385, filtro de barreira BA420. As amostras visíveis foram observadas com luz branca e contraste de phase PH1. As imagens em ambos os casos foram adquiridas com uma câmara CCD Evolution™ MP5.1 usando o software Image-Pro Plus, ambos da Media Cybernetics, Inc. (EUA).

6.2. Primeiros Ensaios Laboratoriais Efectuados

Numa fase inicial começou-se por realizar ensaios genéricos, sem controlar parâmetros importantes dos ensaios como por exemplo o tempo de penetração e de aderência utilizado, utilizando várias fontes para produzir o campo eléctrico de modo a saber que tipo de ensaios se deveriam realizar e de que forma se poderiam efectuar.

De seguida vão ser abordados os diversos ensaios realizados para testar as metodologias e os equipamentos desenvolvidos para os mesmos.

1º Ensaio Realizado:

Para este ensaio utilizou-se o gerador de sinais (número 1 da Figura 6.2) ligado a uma bobina de ignição automóvel (numero 2 da Figura 6.2), ligando posteriormente a bobina de ignição às placas de campo eléctrico (número 3 da Figura 6.2). Assim, após algumas afinações de parâmetros no gerador de sinais, introduziu-se nas placas uma diferença de potencial de 500V (RMS), valor esse medido por um voltímetro (número 4 da Figura 6.2), sendo utilizada uma frequência de 2KHz ditada pelo gerador de sinais.

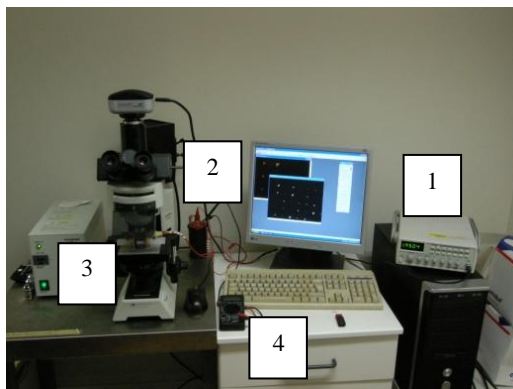


Figura 6.2 – Dispositivo utilizado

Deitou-se uma gota da suspensão bacteriana contendo as bactérias carregadas negativamente em cima da amostra de alumínio, a qual foi colocada de seguida entre as placas de campo eléctrico com os parâmetros referidos anteriormente.

Através de imagens obtidas em tempo real no microscópio, observou-se se haveria alguma movimentação das células na suspensão bacteriana provocada pelo campo eléctrico, o que não se veio a verificar. Na Figura 6.3 é possível observarem-se as bactérias da suspensão bacteriana, sendo estas, os pontos mais verde-fluorescentes que se observam na figura.

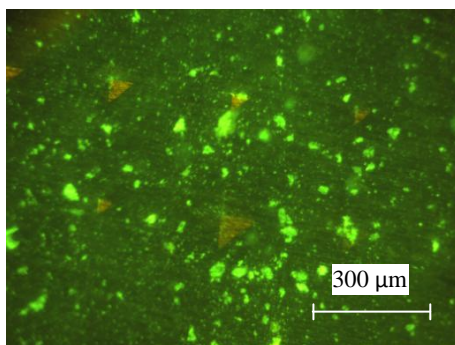


Figura 6.3 – Imagem obtida com o microscópio da suspensão de bactérias após a deposição

De seguida procedeu-se à etapa de remoção do excesso de fluido bacteriano remanescente na superfície da amostra.

Após observação ao microscópio verificou-se que não existiam bactérias em número significativo nos defeitos da matriz, sendo mesmo poucos os defeitos que apresentavam bactérias no seu interior. Na Figura 6.4 pode ver-se que apenas só um defeito contém bactérias no seu interior, encontrando-se este defeito identificado com o número 1. Não havia também nenhuma relação entre o tamanho do defeito e a entrada de bactérias no seu interior: defeitos grandes poderiam não ter qualquer célula enquanto outros mais pequenos poderiam conter algumas células.

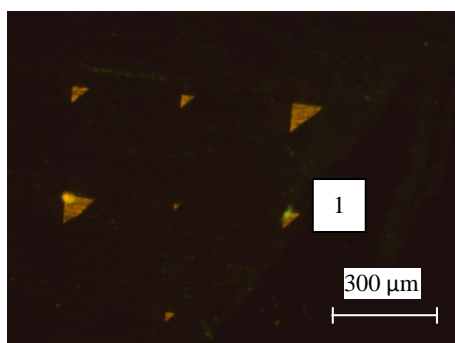


Figura 6.4 – Imagem obtida com o microscópio com o filtro U-MWB ilustrativa dos resultados do 1º ensaio

2º Ensaio Realizado:

Neste ensaio utilizaram-se novamente bactérias com carga negativa, tendo sido colocada uma gota de suspensão bacteriana sobre a superfície da amostra de alumínio. Desta vez ligaram-se as placas de campo eléctrico directamente à rede eléctrica através de uma ficha. A tensão da rede é de 230V e tem uma frequência de 50Hz, sendo estes os parâmetros utilizados para este ensaio.

Colocou-se a amostra entre as placas eléctricas durante cerca de 5 minutos e observou-se ao microscópio, não se tendo avistado qualquer tipo de movimentações significativas, tal como no ensaio anterior.

Procedeu-se posteriormente à etapa de remoção do excesso.

Voltou a colocar-se a amostra no microscópio para observar os resultados, não se tendo visualizado novamente nenhum tipo de resultado relevante, conforme se mostra na Figura 6.5, em que se têm poucas bactérias existentes sobre a amostra, como se constata pela não existência de praticamente pontos verde fluorescente (representativos da existência de bactérias) nos defeitos.

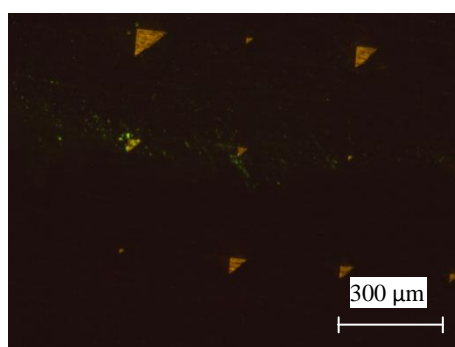


Figura 6.5 – Imagem obtida com o microscópio com o filtro U-MWB ilustrativa dos resultados do 2º ensaio

3º Ensaio Realizado:

Utilizou-se neste ensaio novamente a amostra de alumínio, tendo sido colocada uma gota de suspensão bacteriana, contendo bactérias carregadas negativamente, sobre a sua superfície. Na Figura 6.6 pode observar-se a suspensão bacteriana após a sua colocação sobre a amostra.

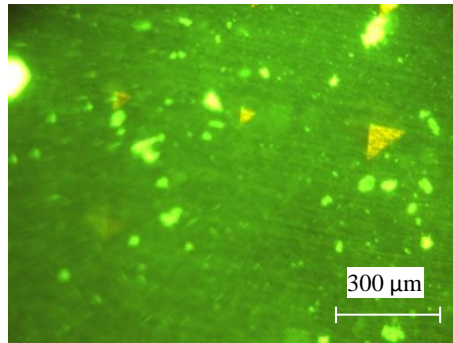


Figura 6.6 – Imagem da suspensão bacteriana depositada sobre a amostra de alumínio

Neste ensaio alterou-se o procedimento usado para tentar provocar a movimentação das bactérias existentes no fluido bacteriano. Desta forma, fez-se passar a corrente eléctrica directamente pelo próprio material em análise, neste caso a amostra de alumínio, em vez de se utilizarem as placas de campo eléctrico, como anteriormente utilizado. Através de uma ficha ligada à rede eléctrica fez-se passar corrente vinda da rede pública pela amostra durante breves segundos, utilizando um transformador.

Observou-se a amostra ao microscópio, enquanto se fazia passar a corrente eléctrica por esta, não se tendo verificado qualquer tipo de movimentação adicional provocada nas bactérias.

Concluída a fase de passagem de corrente eléctrica pela amostra procedeu-se à etapa de remoção do excesso superficial, sendo a amostra de seguida observada ao microscópio. Mais uma vez não existiu praticamente aglomeração de bactérias nos defeitos da matriz da amostra, pois eram poucos os pontos fluorescentes que se conseguem observar, como fica comprovado na Figura 6.7.

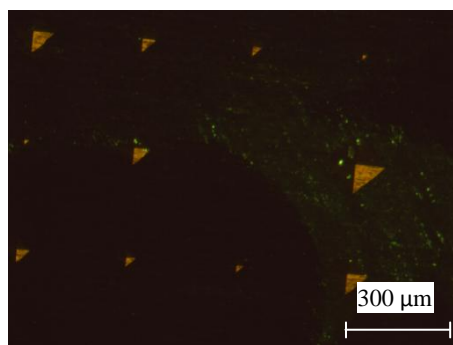


Figura 6.7 – Imagem observada ao microscópio com o filtro U-MWB ilustrativa dos resultados do 3º ensaio

4º Ensaio Realizado:

Neste ensaio voltou-se a alterar o equipamento utilizado para provocar o movimento desejado nas bactérias, passando a utilizar-se um dos geradores de campos magnéticos, como o que se pode

observar na Figura 6.8. Procedeu-se à ligação do gerador de sinais directamente ao gerador de campos magnéticos de modo a produzir um campo magnético, sendo este campo guiado até à amostra pelo varão de aço.



Figura 6.8 – Gerador de campos magnéticos

Colocando nova gota de suspensão bacteriana contendo células carregadas negativamente sobre a superfície da amostra de alumínio, e direccionando o campo magnético em direcção à zona em que se encontrava a suspensão de células bacterianas, voltou a não observar-se nenhum tipo de movimentação especial das bactérias que possa ter sido provocada pela utilização do gerador de campos magnéticos. Na Figura 6.9, pode observar-se uma imagem retirada no momento em que se aplicavam os campos magnéticos à amostra de alumínio.

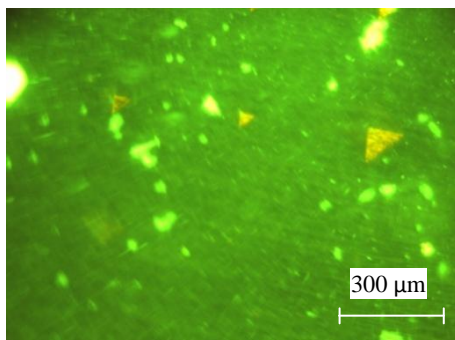


Figura 6.9 – Imagem obtida ao microscópio da suspensão bacteriana aquando da aplicação do campo magnético

5º Ensaio Realizado:

Neste ensaio utilizou-se a suspensão bacteriana que continha na sua composição bactérias com carga superficial positiva.

Colocou-se uma gota desta suspensão bacteriana sobre a superfície da amostra de alumínio e deixou-se estar cerca de 2 minutos o fluido em repouso e sem qualquer tipo de acção externa com algum tipo de equipamento para provocar movimentação das bactérias.

Procedeu-se à etapa de remoção do excesso de líquido e em seguida colocou-se a amostra no microscópio para a observar. Pela primeira vez conseguiram-se resultados positivos, pois mesmo após a operação de remoção do excesso é possível observar-se um grande aglomerado de bactérias nos

defeitos da amostra, evidenciando claramente os defeitos existentes, tal como fica demonstrado pela visualização da Figura 6.10.

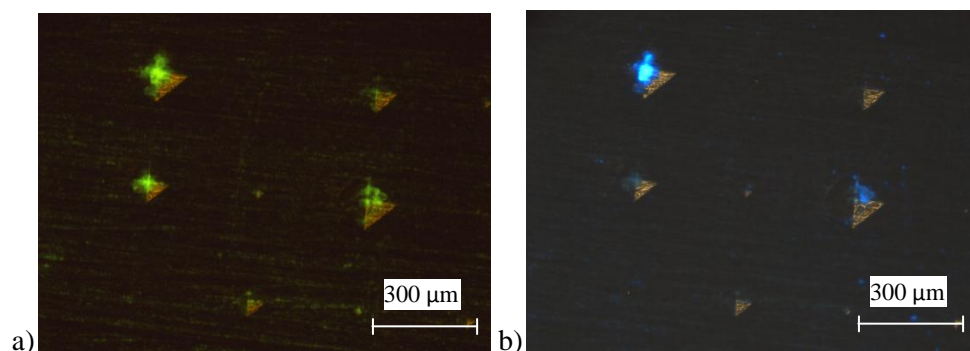


Figura 6.10 – Imagem obtida ao microscópio ilustrativa do 5º ensaio: a) utilizando o filtro U-MWB, b) utilizando o filtro U-MWU

De forma a procurar evidenciar ainda mais os defeitos e após visualização de células bacterianas dentro dos defeitos por microscopia, a amostra de alumínio foi colocada em 10 mL de meio mineral de crescimento contendo 0.25% (v/v) de etanol absoluto num tubo falcon de 50 mL, tendo-se de seguida colocado o tubo numa incubadora que se encontrava em funcionamento a 200 rpm e a 28°C. Após 24h na incubadora, a amostra foi retirada do meio de crescimento e observada a olho nu para investigar o aparecimento de colónias de bactérias que identificassem a localização dos defeitos. Na amostra de alumínio observou-se a formação de um filme, praticamente em monocamada, de células sobre toda a superfície não sendo possível identificar os locais onde se encontravam os defeitos (Figura 6.11).

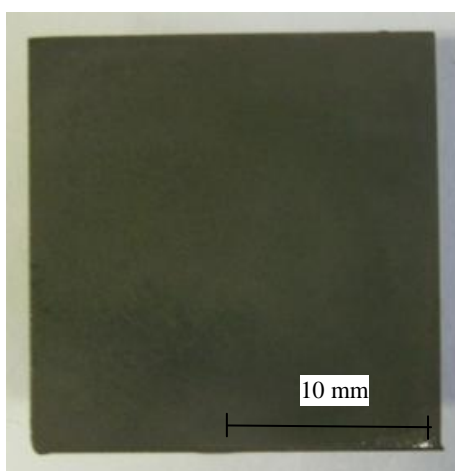


Figura 6.11 – Fotografia da amostra de alumínio após 24h na incubadora

6º Ensaio Realizado:

Neste ensaio utilizou-se a amostra de aço e uma mistura dos dois tipos de bactérias (positivas e as negativas). Sobre a matriz diagonal colocaram-se as bactérias carregadas negativamente, sobre a matriz aleatória colocaram-se as bactérias carregadas positivamente e sobre a matriz alternada colocou-se um misto de bactérias de carga positiva e negativa.

Contabilizaram-se 5 minutos para a penetração e aderência, tendo-se efectuado a etapa de remoção do excesso findado este período de tempo.

De seguida levou-se a amostra ao microscópio. Mais uma vez as bactérias carregadas negativamente não produziram grandes efeitos, encontrando-se um baixo número destas nos defeitos da matriz, como fica comprovado na Figura 6.12.

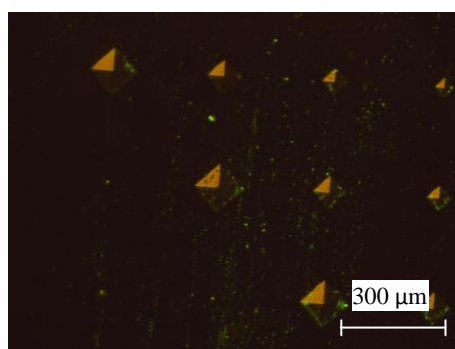


Figura 6.12 – Imagem obtida ao microscópio, com a utilização do filtro U-MWB, ilustrativa das bactérias negativas na matriz diagonal

Já na matriz em que se colocaram as bactérias positivas, os resultados foram bem melhores, encontrando-se com bastante facilidade a presença de bactérias nos defeitos, mesmo nos mais pequenos, tal como se mostra na Figura 6.13.

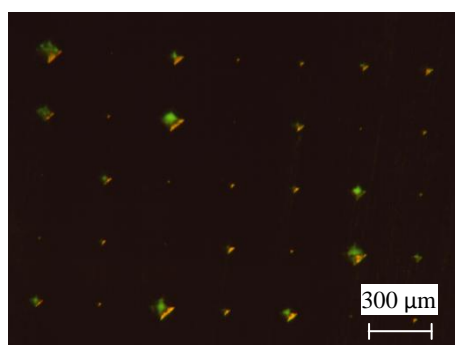


Figura 6.13 – Imagem observada ao microscópio, com a utilização do filtro U-MWB, ilustrativa das bactérias positivas da matriz aleatória

Quando se utilizou uma mistura de bactérias positivas e negativas também conseguiram-se resultados bastante satisfatórios, aparecendo evidenciados quase todos os defeitos da matriz alternada, sendo facilmente visível na Figura 6.14. É também notório, que esta mistura de bactérias produz uma fluorescência bastante acentuada nos defeitos, tornando bastante visíveis ao microscópio os defeitos existentes.

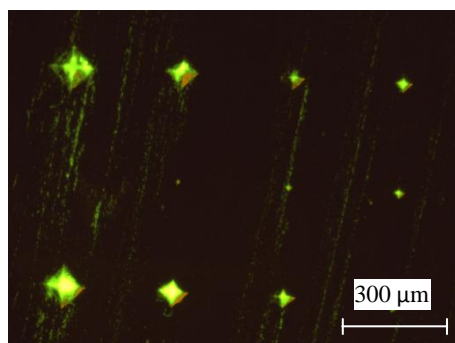


Figura 6.14 - Imagem ilustrativa da mistura de bactérias positivas e negativas na matriz diagonal

Para procurar evidenciar ainda mais os defeitos, tal como também foi feito para a amostra de alumínio, e após visualização de células bacterianas dentro dos defeitos por microscopia, colocou-se a amostra de aço em 10 mL de meio mineral de crescimento contendo 0.25% (v/v) de etanol absoluto num tubo falcon de 50 mL (Figura 6.15), tendo-se de seguida colocado o tubo numa incubadora que se encontrava em funcionamento a 200 rpm e a 28°C (Figura 6.16). Após 24h na incubadora, a amostra foi retirada do meio de crescimento e observada a olho nu de modo a investigar o aparecimento de colónias de bactérias que identificassem a localização dos defeitos existentes. Na amostra de aço conseguiram-se bons resultados, a comprovar pela observação da Figura 6.17. Nesta figura facilmente se observam grande parte dos defeitos piramidais da amostra, em virtude de se terem desenvolvido colónias de bactérias (com a forma de calotes esféricas), mas só nas matrizes alternada (que continha bactérias positivas e negativas misturadas) e aleatória (que continha apenas bactérias positivas). É também visível na Figura 6.17, a existência de colónias de bactérias alinhadas com pequenos riscos, que ficaram na superfície da amostra devido à operação de polimento desta. Tal demonstra que o processo de identificação de defeitos proposto foi eficaz para a sua identificação, mesmo para defeitos que não foram feitos propositadamente.



Figura 6.15 – Amostra de aço colocada num tubo falcon contendo meio mineral e uma fonte de carbono para permitir o crescimento celular e o desenvolvimento de colónias.



Figura 6.16 – Incubadora utilizada

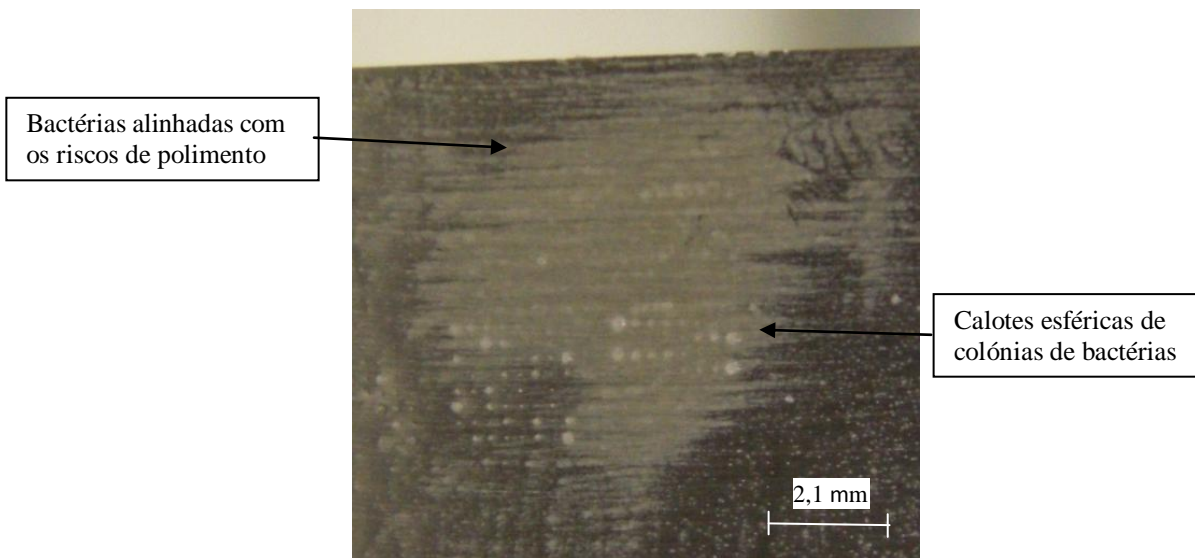


Figura 6.17 – Fotografia em que é possível visualizar o desenvolvimento de colónias de bactérias na superfície do aço

6.3. Ensaios Laboratoriais Utilizando um Gerador de Alta Tensão e as Placas de Campo Eléctrico

Após a utilização de várias técnicas para a produção de campo eléctrico (nos primeiros ensaios realizados), em que se tinha sempre uma frequência variável, optou-se para estes novos ensaios a utilização de uma fonte de tensão, apresentada na Figura 6.18 a), ligada às placas de campo eléctrico, Figura 6.18 b), (que se encontravam montadas no microscópio para possibilitar a análise detalhada dos ensaios a efectuar). A tensão utilizada podia variar entre 0 e os 10000V.

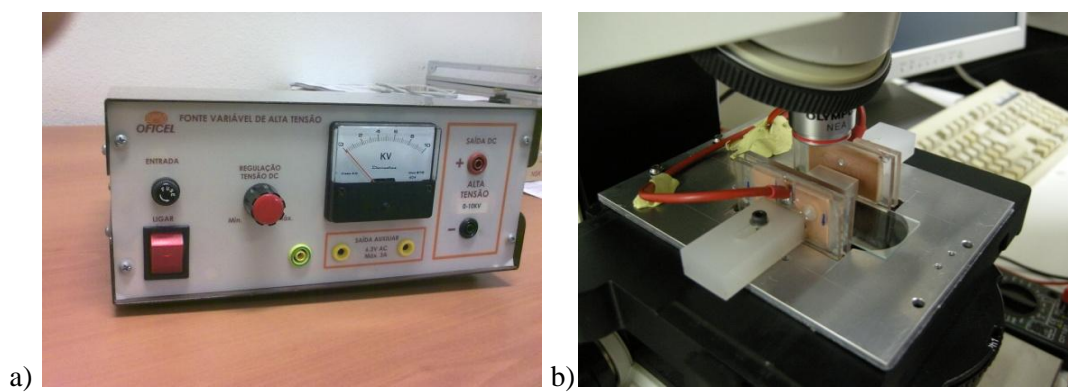


Figura 6.18 – Elementos fundamentais para a produção do campo eléctrico: a) fonte de tensão, b) placas de campo eléctrico

Na Figura 6.19 apresenta-se uma ilustração representativa das placas de campo eléctricas com os parâmetros fundamentais para os ensaios efectuados.

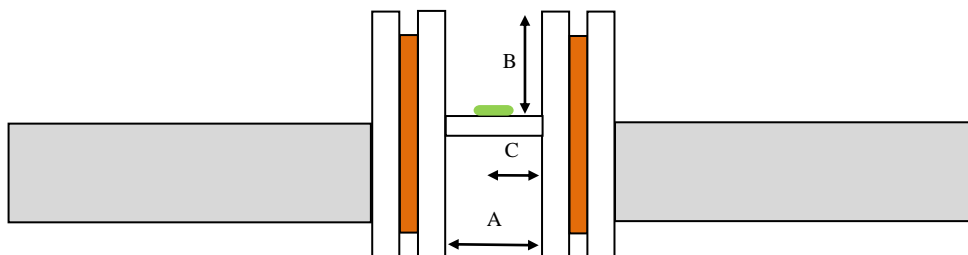


Figura 6.19 – Ilustração das placas de campo eléctrico, com os parâmetros A, B e C utilizados: A – Distância entre a parte interior das placas de campo eléctrico, B – Posição da amostra de material em relação da parte superior do acrílico das placas de campo eléctrico, C – Posição da suspensão de bactérias colocada sobre as amostras em análise, servindo a face da placa direita como referência

Na Tabela 6.1, encontram-se os parâmetros de dois ensaios realizados com o intuito de testar e comprovar o funcionamento do equipamento utilizado para a produção dos campos eléctricos. Para isso colocaram-se sobre uma lamela de vidro, nano partículas de óxido de ferro Fe^{3+} , sendo esta lamela colocada posteriormente nas placas de campos eléctricos com os parâmetros indicados na Tabela 6.1. Tanto no primeiro como no segundo ensaio foi possível observar as nano partículas de óxido de ferro Fe^{3+} a movimentarem-se sobre a lamela de vidro, deslocando-se estas sempre em direcção da placa carregada negativamente, facto que foi visualizado por terem sido efectuadas diversas trocas de polaridade das placas.

Assim com estes dois ensaios efectuados tem-se a garantia de que o dispositivo montado para os campos eléctricos se encontra em funcionamento.

Tabela 6.1 – Condições utilizadas nos ensaios realizados usando apenas nano partículas de óxido de ferro Fe^{3+}

Ensaio nº	Material analisado para o ensaio	A (mm)	B (mm)	C (mm)	Tensão (V)
1º	Lamela de vidro	20	12.5	10	Entre 0 e 10000
2º		6	0	3	Entre 0 e 10000

Na Tabela 6.2 apresentam-se os ensaios realizados em que se aplica à suspensão bacteriana utilizada um campo eléctrico.

No 1º ensaio da Tabela 6.2, cumpriu-se na íntegra com todos os passos definidos para a metodologia genérica de teste, aplicando a variante que utiliza as placas de campo eléctrico, tendo sido registado o tempo de penetração e aderência da suspensão de bactérias, assim como o ângulo de lavagem da superfície da amostra de PMMA. Neste ensaio manteve-se a fonte de tensão sempre ligada, fazendo variar a tensão que era aplicada nas placas. Neste ensaio não foi possível detectar nenhuma movimentação das bactérias provocada pelos campos eléctricos enquanto se observava pelo microscópio. Após a etapa de remoção do excesso de suspensão bacteriana da superfície da amostra, esta foi observada ao microscópio para determinar se existiam bactérias nos defeitos produzidos. Tal não se veio a verificar, como se pode visualizar na Figura 6.20.

A partir do 2º ensaio da Tabela 6.2 iniciou-se uma sequência de ensaios meramente destinados a estudar o comportamento das bactérias (observando-as para isso ao microscópio) quando sujeitas a um campo eléctrico, nomeadamente procurar descobrir como se movimentam e como são afectadas pelo campo eléctrico a que são sujeitas. Assim, optou-se por não efectuar a cronometragem do tempo de deposição, penetração e aderência da suspensão de bactérias, assim como também não se procedeu à etapa de remoção do excesso da amostra para posterior análise dos resultados ao microscópio. Foi por isso que também em vários dos ensaios se procedeu ao estudo do comportamento das bactérias utilizando uma lamela de vidro, estando esta livre de quaisquer tipos de defeitos.

Assim para os 2º, 3º e 4º ensaios da Tabela 6.2, procedeu-se de forma similar, variando apenas o tipo de bactérias utilizadas, assim como os parâmetros A, B e C utilizados. Nestes ensaios, fez-se oscilar o valor da fonte de tensão entre 0 e 10000V, mantendo-se a fonte sempre ligada, não se tendo observado ao microscópio nenhuma movimentação assinalável das bactérias enquanto se procedia à oscilação da tensão.

Nos ensaios 5 e 6 da Tabela 6.2, utilizaram-se os mesmos parâmetros, variando apenas o tipo de bactérias utilizadas. Nestes ensaios, optou-se por manter a tensão emitida pelo gerador de tensão constante, fazendo nestes casos ligar e desligar varias vezes o gerador. Com isto, conseguiu-se observar pequenos movimentos bruscos (muito rápidos), na direcção perpendicular à face das placas, quando se ligava o gerador de tensão, regressando as bactérias de seguida à posição inicial em que se encontravam inicialmente.

Nos ensaios 7 e 8 da Tabela 6.2, optou-se por experimentar misturar as nano partículas de óxido de ferro Fe^{3+} com a suspensão de bactérias, quer com as bactérias positivas, quer com as negativas, mantendo a lamela de vidro como a superfície em que se efectuam os ensaios. Novamente verifica-se que apenas no momento em que se liga a fonte de tensão é que se consegue visualizar uma movimentação brusca por parte das bactérias, fazendo estas logo de seguida o percurso inverso com tendência a recuperar a posição inicial em que se encontravam, sendo esta movimentação perpendicularmente em relação à face das placas de campo eléctrico. Na Figura 6.21 apresenta-se uma imagem da suspensão de bactérias no momento em que esta era sujeita ao campo eléctrico. No caso das bactérias positivas estes movimentos são mais pequenos que no caso das bactérias negativas, percorrendo uma menor distância quando se procede ao ligar da fonte de tensão.

Para os ensaios 9, 10 e 11 da Tabela 6.2, foram analisadas sempre amostras de aço. Nos ensaios 9 e 10 foi ensaiada a amostra de aço com as indentações obtidas no micro durómetro, enquanto que no ensaio 11 utilizou-se uma lâmina de um afia lápis (Figura 6.22), que por ter menor largura permitiu aproximar mais as placas electrizadas que produzem o campo eléctrico, aumentado assim a sua intensidade. Os resultados para estes três ensaios foram inesperados, pois em qualquer deles não se conseguiu observar nenhuma movimentação das bactérias quer quando se mantinha a fonte de tensão ligada e fazia variar a tensão (algo que já era de esperar em virtude dos resultados nos ensaios anteriores), quer quando se ligava e desligava rapidamente a fonte de tensão. Mal se colocava a suspensão de bactérias sobre a amostra de aço ou da lâmina do afia, as bactérias eram logo atraídas para a superfície do material, ficando desde logo imobilizadas e com isso insensíveis aos campos eléctricos produzidos pelas placas. No que diz respeito ao 12º ensaio, verificaram-se resultados semelhantes aos ensaios analisados neste parágrafo, tendo-se utilizado em vez de uma amostra de aço a amostra de alumínio.

No 13º ensaio da Tabela 6.2 testou-se a amostra de PMMA, tendo-se conseguido tal como nos ensaios 5, 6, 7 e 8 pequenas movimentações bruscas (perpendiculares às faces das placas de campo eléctrico) por parte das bactérias apenas quando se ligava a fonte de tensão.

Assim, no que diz respeito aos campos eléctricos experimentados, verificou-se que os parâmetros utilizados não produziram os efeitos desejados de movimentação para os vários materiais ensaiados. No caso do PMMA e dos ensaios que se fizeram na lamela de vidro é possível verificar pequenas movimentações bruscas das bactérias quando se ligava e desligava rapidamente a fonte de tensão. Para o alumínio e aço, não se verificou nenhum tipo de movimentação, quer quando se ligava e desligava a fonte de tensão, quer quando se mantinha esta ligada e se fazia variar a tensão emitida pela fonte de tensão.

Tabela 6.2 – Ensaio realizados utilizando uma suspensão bacteriana, sujeita à aplicação de campos eléctricos

Ensaio n°	Material analisado	Tipo de suspensão bacteriana	A (mm)	B (mm)	C (mm)	Tensão (V)	Tempo de deposição, penetração e aderência da suspensão de bactérias	Ângulo de lavagem	
1°	PMMA	Com bactérias positivas	26	12,5	13	Entre 0 e 9000	5min	45°	
2°	Lamela de vidro	Com bactérias negativas	26	12,5	13	Entre 0 e 10000	Sem cronometragem	Sem lavagem	
3°		Com bactérias negativas	20	12,5	10				
4°		Com bactérias positivas	20	12,5	10				
5°		Com bactérias negativas	6	0	3				
6°		Com bactérias positivas	6	0	3				
7°		Com bactérias negativas + nano partículas de óxido de ferro Fe ³⁺	6	0	3	10000			
8°		Com bactérias positivas + nano partículas de óxido de ferro Fe ³⁺	6	0	3	Entre 0 e 10000			
9°	Amostra de aço	Com bactérias negativas + nano partículas de óxido de ferro Fe ³⁺	20	5	10				
10°	Amostra de aço	Com bactérias negativas	20	5	10	Entre 0 e 10000	Sem cronometragem	Sem lavagem	
11°	Lâmina de aço	Com bactérias negativas	6	5	3	Entre 0 e 10000		Sem lavagem	
12°	Amostra de alumínio	Com bactérias negativas	20	5	10	Entre 0 e 10000		Sem lavagem	
13°	Amostra de PMMA	Com bactérias negativas	13	5	6,5	Entre 0 e 10000		Sem lavagem	

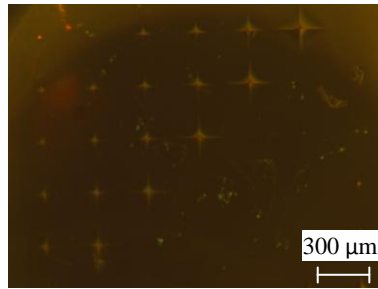


Figura 6.20 – Constatação ao microscópio da não existência de bactérias nas indentações

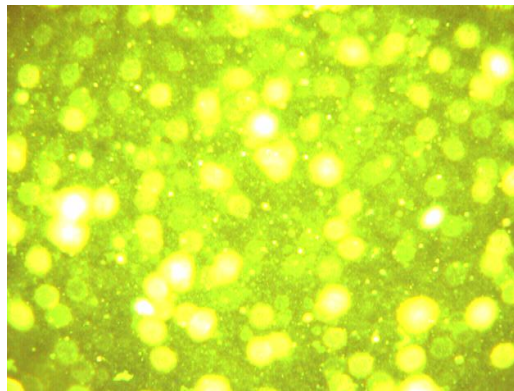


Figura 6.21 – Imagem captada ao microscópio da suspensão de bactérias negativas com nano partículas de óxido de ferro Fe^{3+}



Figura 6.22 – Lâmina de aço utilizada

6.4. Ensaaios Experimentais Sem a Utilização de Campos Eléctricos e Magnéticos

Os ensaios presentes neste ponto do Capítulo 6, utilizaram a metodologia genérica de teste, ou seja, aquela que não requer a aplicação de campos eléctricos ou magnéticos sobre a amostra em análise.

Para os vários ensaios realizados, pretendeu sobretudo avaliar-se como o tempo que decorre entre a fase de deposição, penetração e aderência da suspensão de bactérias no material da amostra em análise influencia os resultados para cada ensaio. Assim, para os vários materiais ensaiados, foram

testados e analisados diversos tempos de penetração e aderência, de modo a procurar um tempo óptimo de ensaio, ou seja, aquele em que, após a fase de remoção de excesso se encontravam o maior número de bactérias nos defeitos. Pretendeu-se também verificar qual a suspensão celular que permitia uma melhor identificação dos defeitos, em cada tipo de material.

Nos ensaios em que foi utilizada a suspensão de bactérias com carga superficial positiva, e uma vez que elas formam aglomerados com alguns milímetros de diâmetro (como se pode ver na Figura 6.23), a “pasta” de células foi colocada sob a forma de camada com a ajuda da ponta da pipeta sobre a superfície da amostra em análise, de modo a ajudar a penetração das bactérias nos micro-defeitos produzidos. Utilizou-se sempre esta metodologia, para distribuir melhor as bactérias pela superfície do material, uma vez que os aglomerados produzidos durante o crescimento em hexadecano são pastosos, aderindo facilmente ao plástico e vidro utilizados. Desta forma, pretendia-se garantir que as células estavam uniformemente distribuídas sobre a superfície e possíveis defeitos.

No caso das bactérias negativas não houve a necessidade de fazer o espalhamento de células aquando da deposição da suspensão bacteriana, em virtude de nesta suspensão as bactérias se encontrarem dispersas (e não em aglomerados) no meio de cultura.



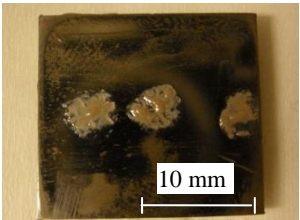
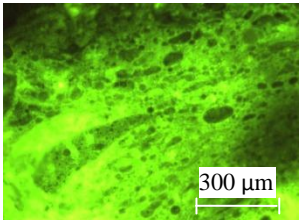
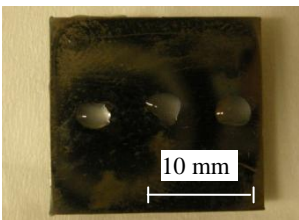
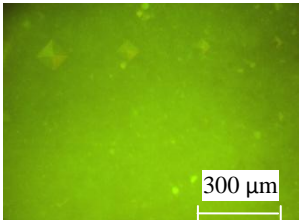
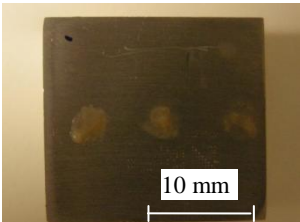
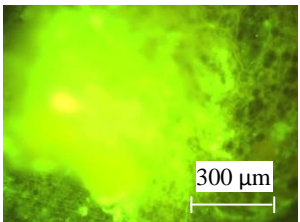
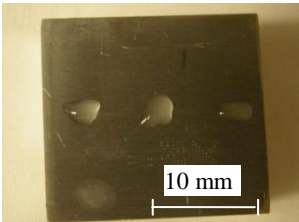
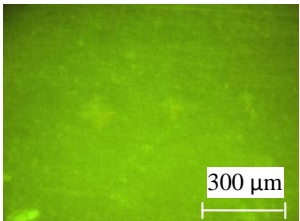
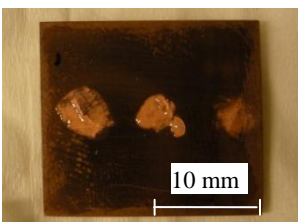
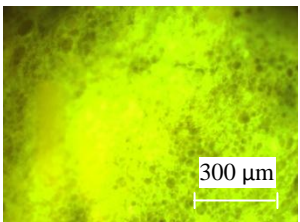
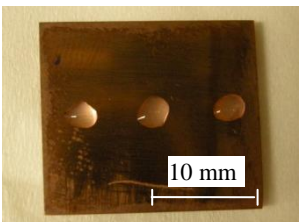
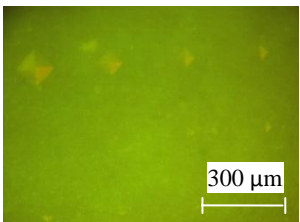
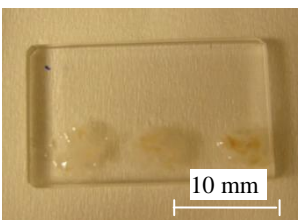
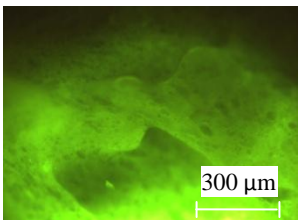
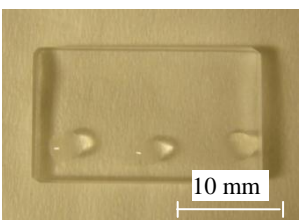
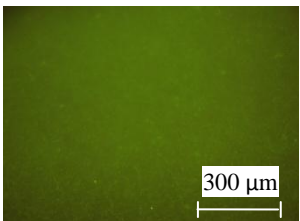
Figura 6.23 – Aglomerados de bactérias crescidas em hexadecano com carga superficial positiva no seu meio de crescimento

Na Tabela 6.3 apresentam-se fotografias captadas por uma máquina fotográfica digital (Nikon Coolpix P5100), e pela câmara digital acoplada ao microscópio, para os dois tipos de bactérias utilizadas (com carga superficial positiva ou negativa) e para os vários materiais. Assim, a suspensão de bactérias positivas apresenta uma cor cinzenta/acastanhada (quando se vê a olho nu) e é bastante pastosa, como se pode ver pelas fotografias captadas ao microscópio. Já a suspensão de bactérias negativas apresenta-se totalmente transparente a olho nu, parecendo-se de certa forma com gotas de água.

Na Tabela 6.3, e pela análise das fotos captadas ao microscópio, verificou-se novamente uma diferença substancial no aspecto entre as duas suspensões bacterianas durante a fase de deposição.

Assim verificou-se uma maior concentração de bactérias em certas zonas da superfície (visível pelas enormes manchas a verde fluorescente), existindo outras com uma concentração diminuta, para o caso da suspensão de bactérias positivas, ao passo que para a suspensão de bactérias negativas verificou-se que estas se encontravam de certa forma distribuídas uniformemente pela superfície das amostras. Outra diferença que se pôde notar durante a fase de deposição foi que para a suspensão de bactérias positivas não se conseguiam visualizar os defeitos das amostras quando estas cobriam a superfície, devido ao grande aglomerado de bactérias. No entanto, para a suspensão de bactérias negativas isto já não acontece, uma vez que as células estavam dispersas no meio.

Tabela 6.3 – Imagens da etapa de deposição, para os dois tipos de bactérias, com imagens captadas por fotografia digital convencional (à esquerda em cada caso) e com recurso a um microscópio (à direita em cada caso)

Mat	Deposição			
	Bactérias positivas		Bactérias negativas	
Aço				
Al				
Cu				
PM MA				

Em virtude de em ensaios anteriores se ter verificado que o dispositivo construído para a fase de limpeza superficial das amostras não ser suficientemente eficaz para remover as células das várias superfícies testadas, optou-se por na etapa de remoção do excesso, usar-se papel para remover o excesso de suspensão bacteriana existente.

Na Figura 6.24 é possível observar dois aspectos da fase de penetração e aderência das bactérias. Na Figura 6.24 a) é possível observar uma indentação em tamanho grande, totalmente preenchida pela suspensão bacteriana (a verde fluorescente). Assim é possível visualizar como a suspensão de bactérias se distribui no interior dos defeitos produzidos. Já na Figura 6.24 b) é visível como a suspensão bacteriana preenche um risco resultante da lixa de polimento. Também é possível visualizar a existência de bactérias mortas na suspensão bacteriana, que são os pontos vermelhos que se encontram na imagem, representando-se à volta destes uma bola vermelha para facilitar a sua identificação. Assim verifica-se que também as células mortas permitem auxiliar na identificação dos defeitos existentes.

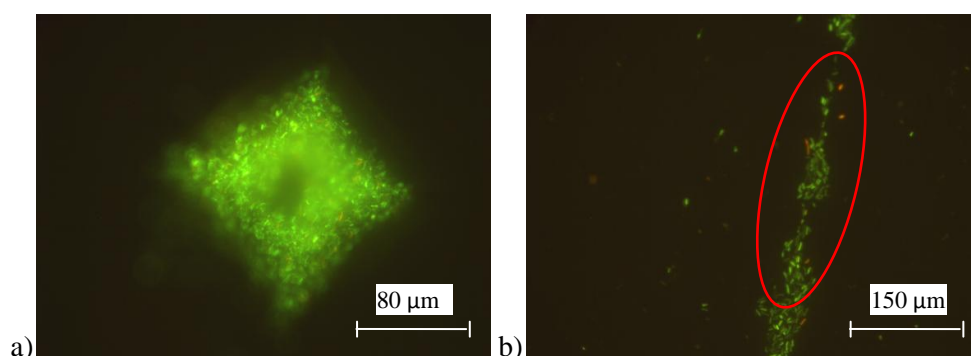


Figura 6.24 – Imagem captada ao microscópio para: a) uma indentação repleta de suspensão bacteriana, b) um risco de uma lixa de polimento preenchida com suspensão bacteriana

As várias tabelas que se apresentam de seguida, contêm fotografias em que se procurou respeitar diversos parâmetros, procurando-se garantir a sua manutenção entre os vários ensaios, pois só assim se conseguem resultados verdadeiramente comparáveis. Assim sendo, as fotografias apresentadas nas Tabelas 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9 e 6.10 foram captadas ao microscópio, utilizando a mesma matriz de defeitos (matriz reduzida), a mesma ampliação e o mesmo tipo de luz. As imagens foram também capturadas por câmara digital após o mesmo tempo de exposição para cada material.

A análise das imagens obtidas durante os vários ensaios e presentes nas Tabelas 6.5, 6.6, 6.7 e 6.8, permitiram determinar diferentes parâmetros que permitem analisar a eficácia do processo proposto, entre os quais o tempo óptimo de penetração e aderência e a dimensão do defeito mais pequeno em que as células conseguem entrar (limiar de detectabilidade). Assim, é possível nesta fase embrionária de estudo desta nova técnica de END, começar a fazer uma selecção dos melhores

parâmetros que deverão ser utilizados em cada material. As imagens presentes nas Tabelas 6.5, 6.6, 6.7 e 6.8 foram captadas ao microscópio, após a etapa de remoção de excesso (o que permite visualizar as bactérias que penetraram nos defeitos e aderiram à superfície) utilizando um filtro U-MWB, que faz com que as bactérias floresçam verdes na presença do comprimento de onda de luz utilizado (luz fluorescente azul). No caso da amostra de PMMA, para além do filtro U-MWB, também se utilizou em simultâneo luz visível, uma vez que este material é suficientemente translúcido para permitir a passagem de luz.

Na Tabela 6.5 podem observar-se as fotografias captadas para a amostra de cobre. Começando pelas bactérias positivas, verificou-se que após 0,5 minutos as bactérias penetraram até ao defeito de 47,3 μm . Quando a suspensão bacteriana foi deixada repousar sobre a superfície durante 1, 2 e 3 minutos, as bactérias conseguiram entrar em defeitos com 34,8 μm . Após 4 minutos de contacto entre a suspensão bacteriana e a superfície da amostra tiveram-se bactérias em defeitos com 47,3 μm , enquanto que após 5 minutos estas estão presentes até defeitos de 66,6 μm . No caso do ensaio para 1 minuto, verifica-se que devido à baixa concentração de bactérias nos defeitos de menores dimensões captados, não é possível observar a presença de bactérias nos defeitos mais reduzidos pela visualização da imagem presente na Tabela 6.5, pelo que se apresenta no Anexo A4 a mesma imagem para este tempo, mas com maiores dimensões.

A partir do ensaio de quatro minutos para penetração e aderência da suspensão bacteriana, aconteceu algo surpreendente, pois a partir deste ensaio começou a diminuir a presença de bactérias detectada nos defeitos, contrariando a tendência inicial de aumento com o passar do tempo de penetração e aderência. A explicação para este fenómeno já foi abordada na revisão bibliográfica: o cobre é um material com propriedades anti-bacterianas. Assim, para a suspensão de bactérias positivas considerou-se que o tempo óptimo de penetração e aderência para o cobre foi de 3 minutos pois, embora seja o terceiro tempo em que se verificou a presença de bactérias até ao defeito de 34,8 μm , apresentava já uma concentração de bactérias nos defeitos mais reduzidos superior comparativamente com os ensaios de 1 e 2 minutos.

Verifica-se na Tabela 6.5, que para a suspensão de bactérias com carga negativa, logo ao fim 0,5 minutos de penetração e aderência já se conseguia obter uma boa concentração de bactérias nos defeitos, encontrando-se estas até ao defeito de 34,8 μm . Após 1, 2, 3, 4 e 5 minutos de penetração e aderência verificou-se a presença de bactérias até ao defeito de 24,5 μm .

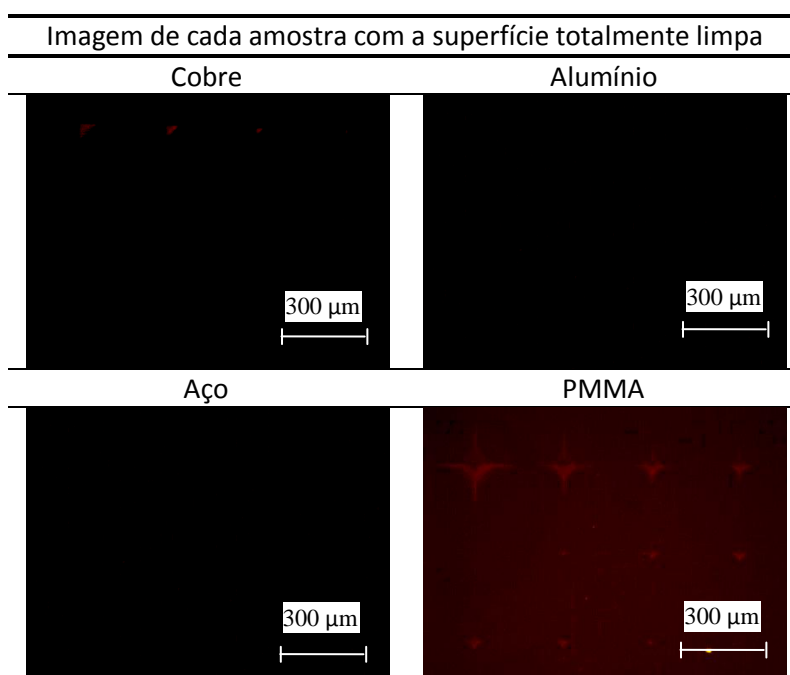
Assim, para a suspensão de bactérias com carga negativa, considerou-se que o tempo óptimo de penetração e aderência no cobre foi de 3 minutos. Apesar de para 1 e 2 minutos também já se terem visualizado bactérias no defeito de 24,5 μm , quando a penetração e adesão foi de três minutos conseguiu-se uma concentração mais significativa de bactérias nesse defeito.

Para os vários tempos ensaiados com a suspensão de bactérias negativas verificou-se uma estabilidade na dimensão dos defeitos em que estas se encontravam, pois só para 0,5 minutos é que não se tinham bactérias presentes até ao defeito de 24,5 μm . Verificou-se também pelas várias imagens da Tabela 6.5 que a concentração de bactérias nos defeitos foi sensivelmente a mesma para os vários tempos ensaiados.

Com estes ensaios verificou-se também que a suspensão de bactérias com carga negativa conseguiu sempre a presença de bactérias em defeitos de dimensão mais reduzida para todos tempos que foram ensaiados, comparativamente com os ensaios realizados com a suspensão de bactérias positivas.

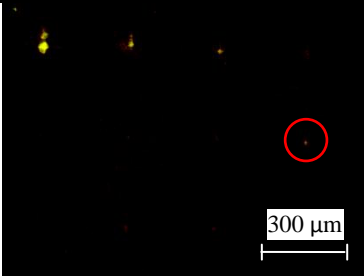
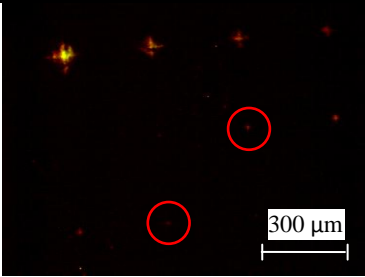
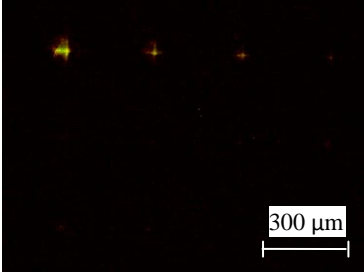
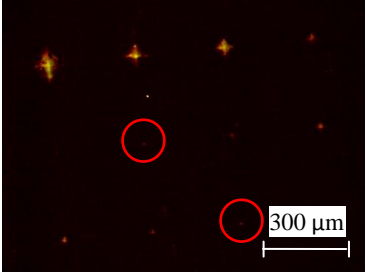
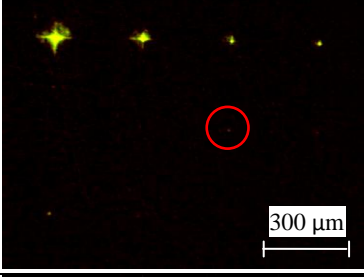
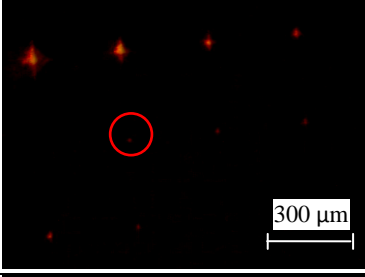
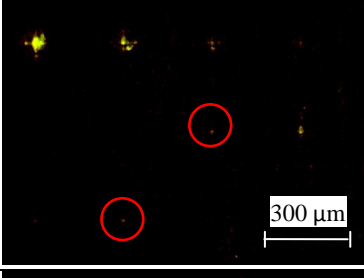
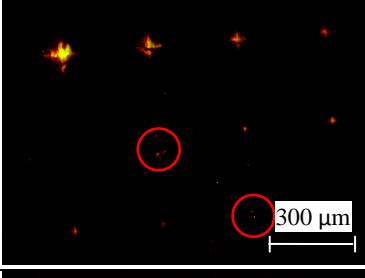
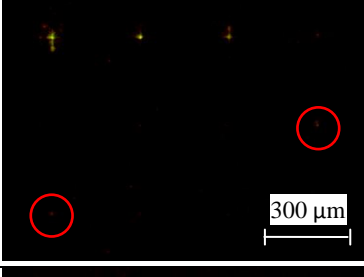
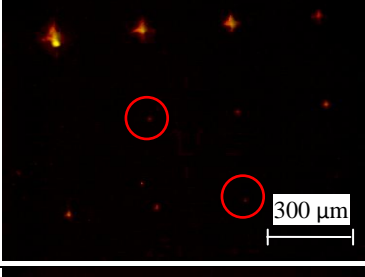
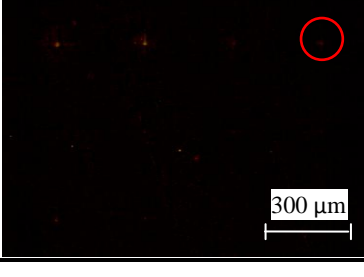
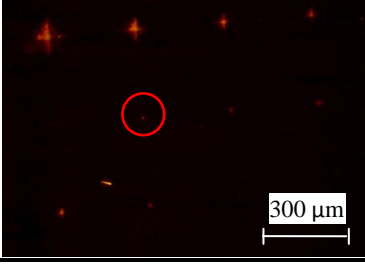
No entanto, apesar dos resultados relativamente positivos para o cobre, principalmente com a suspensão de bactérias negativas, em virtude de este ser um material com propriedades antibacterianas, faz com que seja um material a analisar de forma mais detalhada em futuros ensaios com o objectivo do desenvolvimento desta técnica de END.

Tabela 6.4 – Imagem de cada uma das amostras com a superfície totalmente limpa



Na Tabela 6.4, apresentam-se imagens captadas ao microscópio para as várias amostras ensaiadas, com a superfície totalmente limpa. Assim, pode comparar-se a amostra totalmente limpa com a mesma amostra após a etapa de remoção de excesso e deste modo analisar de que forma são evidenciados os defeitos pela presença de bactérias no seu interior.

Tabela 6.5 – Comparação entre a suspensão de bactérias positivas e negativas para os vários tempos na amostra de cobre

Amostra de cobre		
Tempo (minutos)	Positivas	Negativas
0,5		
1		
2		
3		
4		
5		

Na Tabela 6.6 pretende-se comparar diversos tempos de penetração e aderência para as suspensões de bactérias com carga superficial positiva e negativa, no caso da amostra de alumínio.

Pela análise da suspensão de bactérias com carga superficial positiva, verificou-se que existe um aumento gradual da presença de bactérias nos defeitos com o passar do tempo utilizado para a penetração e aderência, não se tendo encontrado bactérias no defeito mais pequeno produzido no alumínio. Após 0,5 minutos conseguiu-se a penetração e aderência de bactérias até ao defeito de 55,3 μm . Já para 1 e 2 minutos de penetração e aderência teve-se a presença de bactérias até ao defeito de 39,9 μm . Após 3, 4 e 5 minutos verificou-se a presença de bactérias até ao defeito de 30,1 μm , existindo nestes casos uma concentração significativa de bactérias nos defeitos, algo que é ilustrado pela elevada fluorescência que se observa pelo posicionamento das células nos defeitos. No caso dos ensaios de 1 e 2 minutos, verifica-se que devido à baixa concentração de bactérias nos defeitos de menores dimensões, não é possível observar a presença de bactérias nos defeitos mais reduzidos pela visualização da imagem presente na Tabela 6.6, pelo que se apresenta no Anexo A4 a mesma imagem para estes tempos, mas obtida com maior ampliação.

Assim, para a suspensão de bactérias positivas, verificou-se que o tempo óptimo de penetração e aderência para a amostra de alumínio foi de 4 minutos, visto que existia uma concentração de bactérias nos defeitos de dimensão mais reduzida, superior comparativamente com o ensaio efectuado após 3 minutos de aderência.

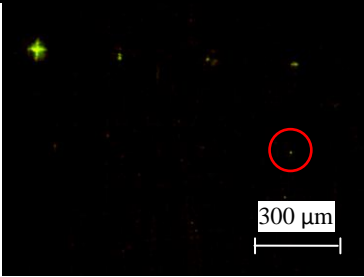
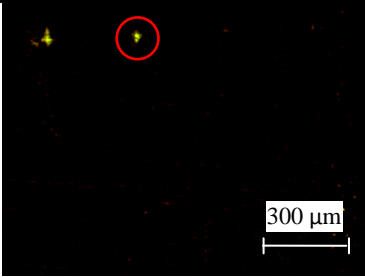
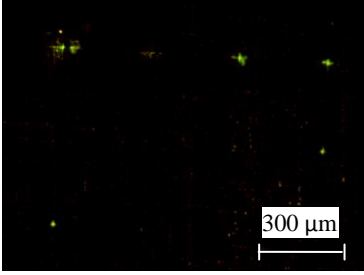
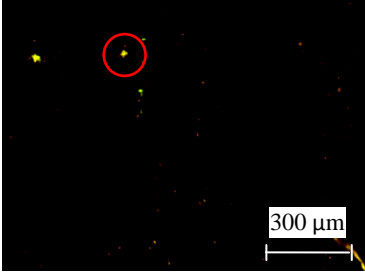
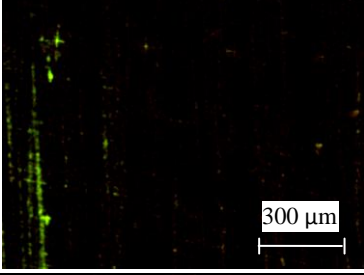
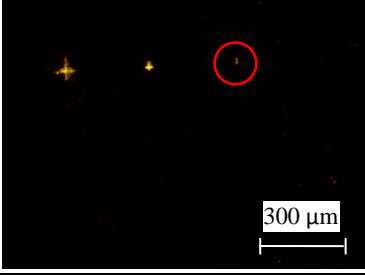
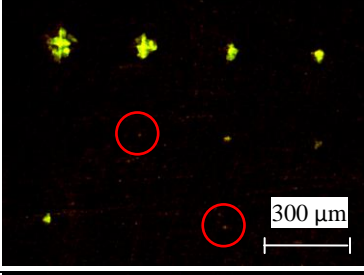
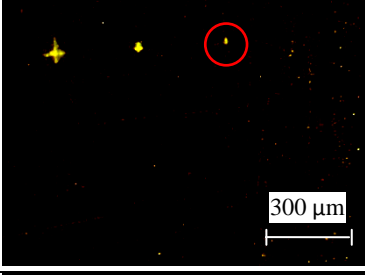
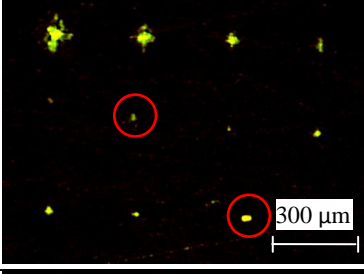
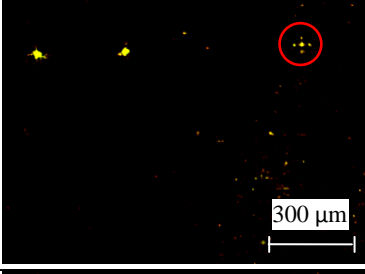
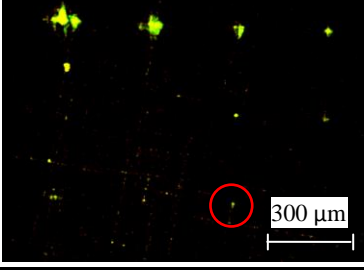
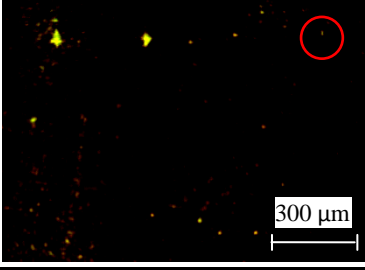
Pela análise da suspensão de bactérias negativas na amostra de alumínio, verificou-se que para 0,5 e 1 minutos de penetração e aderência apenas se tiveram bactérias presentes até ao defeito de 130,8 μm . Quando a suspensão bacteriana foi deixada repousar sobre a superfície durante 2 e 3 minutos conseguiram-se bactérias até ao defeito de 100,6 μm , enquanto que nos ensaios de 4 e 5 minutos tiveram-se bactérias até ao defeito de 80,4 μm . Verificou-se novamente uma tendência de que com o passar do tempo de penetração e aderência ensaiado se foi conseguindo a presença de bactérias em defeitos de dimensão mais reduzida.

Assim, concluiu-se que o tempo óptimo de penetração e aderência para a suspensão de bactérias negativas no caso da amostra de alumínio foi de 4 minutos, em virtude de ser este o tempo mais baixo em que se conseguiu a presença de bactérias em maior número de defeitos.

Para o caso do alumínio, verificou-se sempre a presença de bactérias até defeitos de dimensão mais reduzida para os vários tempos testados quando se utilizou a suspensão de bactérias positivas, quando comparada com a suspensão de bactérias negativas.

Em algumas das fotos da Tabela 6.6, como na foto de 2 minutos para a suspensão de bactérias positivas, mas também nas fotos de 5 minutos para as suspensões de bactérias positivas e negativas, é possível visualizar a existência de alguns riscos a fluorescente (sendo estes resultantes de resquícios de suspensão bacteriana) à superfície da amostra e que são resultado de uma limpeza menos eficaz aquando da etapa de remoção de excesso.

Tabela 6.6 – Comparação entre a suspensão de bactérias positivas e negativas para os vários tempos na amostra de alumínio

Amostra de alumínio		
Tempo (minutos)	Positivas	Negativas
0,5		
1		
2		
3		
4		
5		

Na Tabela 6.7 pode visualizar-se os vários tempos de penetração e aderência para os dois tipos de suspensões bacterianas na amostra de aço.

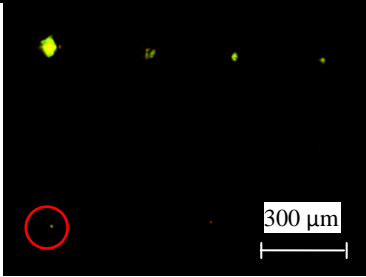
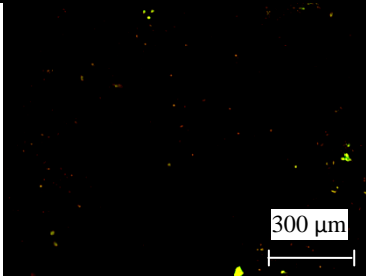
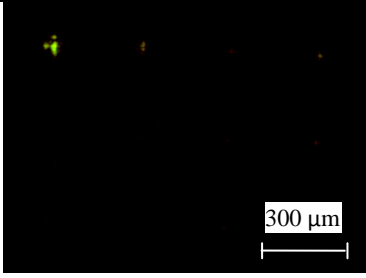
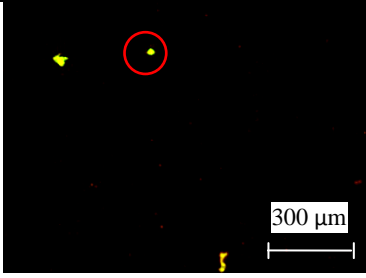
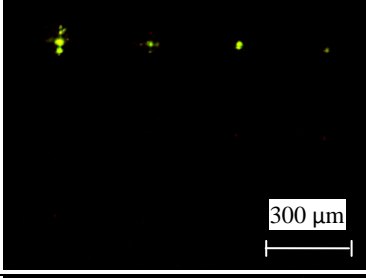
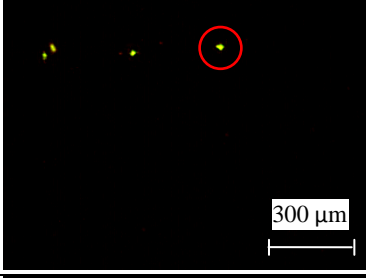
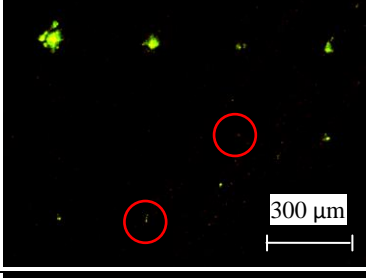
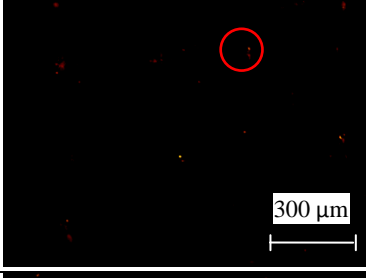
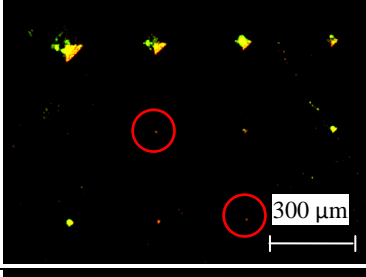
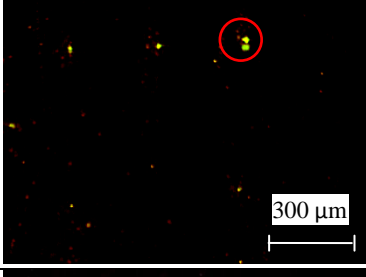
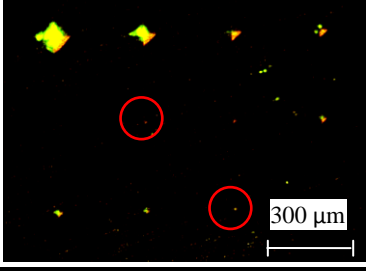
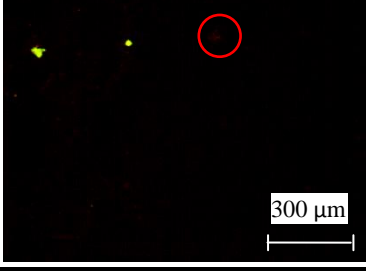
Da análise da suspensão de bactérias com carga superficial positiva, verificou-se que após 0,5 minutos de penetração e aderência, foi visível a presença de bactérias até defeito de 41,4 μm , enquanto que quando a suspensão bacteriana foi deixada repousar sobre a superfície da amostra durante 1, 2 e 3 minutos já se conseguiram ter bactérias até ao defeito de 28,4 μm . Por fim, nos ensaios de 4 e 5 minutos conseguiu-se a presença de bactérias até ao defeito de 20,3 μm , não sendo apenas possível captar a existência destas apenas no defeito de dimensões mais reduzidas. Para os ensaios de 1 e 2 minutos de penetração e aderência, verificou-se que devido à fraca concentração de bactérias presentes nos defeitos de menores dimensões, não é possível visualizar a presença destas nos defeitos mais reduzidos pela visualização da imagem presente na Tabela 6.7, pelo que se apresenta no Anexo A4 a mesma imagem para estes tempos, mas com maiores dimensões.

Assim, concluiu-se que o tempo óptimo para a deposição da suspensão de bactérias com carga superficial positiva é de 4 minutos, em virtude de ser este o primeiro tempo em que se observam bactérias no defeito de 20,3 μm .

Da análise dos ensaios utilizando a suspensão de bactérias com carga negativa na amostra de aço verificou-se que para 0,5 minutos de penetração e aderência sucede algo que ainda não se tinha verificado em ensaios anteriores: não foi possível verificar a presença de bactérias em nenhum dos defeitos, mesmo tendo em conta uma limpeza superficial mais suave aquando da etapa de remoção do excesso, facto que é visível pela presença de alguns pontos fluorescentes à superfície da amostra. Após 1 minuto de penetração e aderência já se conseguiram ter bactérias até ao defeito de 97,4 μm , enquanto que quando a suspensão bacteriana foi deixada repousar sobre a superfície durante 2, 3, 4 e 5 minutos verificou-se a presença de bactérias até ao defeito de 73,5 μm . Assim o tempo óptimo para a suspensão de bactérias negativas foi de 2 minutos, pois foi este o primeiro tempo em que se detectaram bactérias até ao defeito de 73,5 μm . Estes ensaios revelaram uma fraca apetência da suspensão de bactérias negativas para o aço.

Para a amostra de aço, verificou-se que para os vários tempos ensaiados que a suspensão de bactérias positivas produz sempre resultados superiores comparativamente com a suspensão de bactérias negativas. Quer para a suspensão de bactérias positivas, quer para as negativas, verificou-se uma tendência de aparecimento de bactérias em defeitos de dimensões cada vez mais reduzidas com o passar do tempo de ensaio para a etapa de penetração e aderência.

Tabela 6.7 – Comparação entre a suspensão de bactérias positivas e negativas para os vários tempos na amostra de aço

Amostra de aço		
Tempo (minutos)	Positivas	Negativas
0,5		
1		
2		
3		
4		
5		

Na Tabela 6.8 podem visualizar-se as imagens obtidas após a etapa de remoção de excesso para os vários tempos de penetração e aderência para os dois tipos de suspensões bacterianas na amostra de PMMA.

Pela análise da suspensão de bactérias positivas, verificou-se um mau resultado para os tempos de penetração e aderência de 0,5, 1 e 2 minutos, em que não se verificou de todo a presença de bactérias em nenhum dos defeitos. Após 3 minutos de penetração e aderência, visualizavam-se bactérias até ao defeito de 212,5 μm , enquanto que para 4 e 5 minutos têm-se bactérias até ao defeito de 166,8 μm . Visto isto, o tempo óptimo para a suspensão de bactérias positivas foi de 4 minutos.

Para os ensaios de 4 e 5 minutos, verificou-se que devido à fraca concentração de bactérias presentes nos defeitos, não é possível visualizar a presença destas nos defeitos pela visualização da imagem presente na Tabela 6.8, pelo que se encontra no Anexo A4 a mesma imagem para estes tempos, mas utilizando uma maior ampliação.

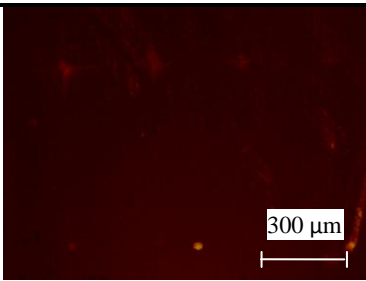
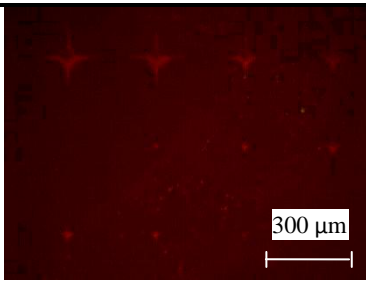
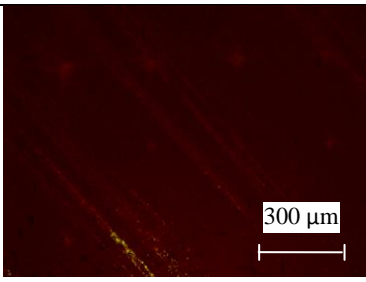
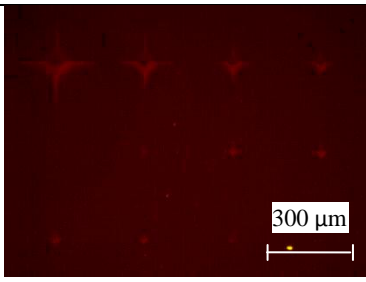
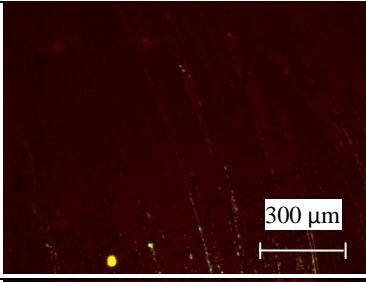
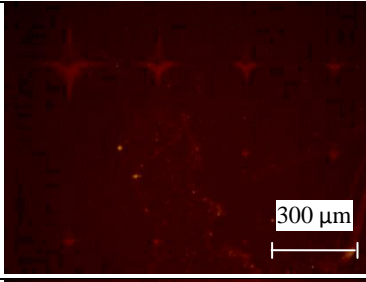
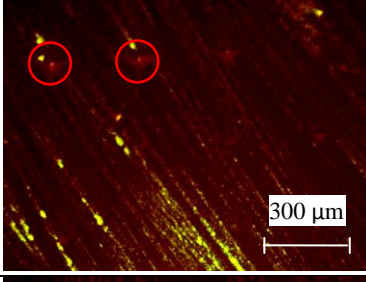
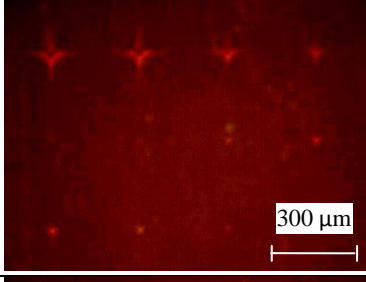
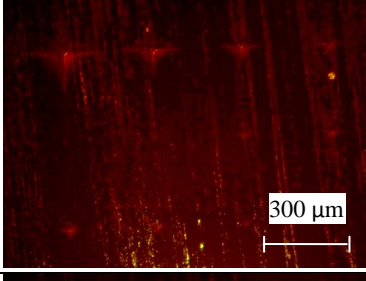
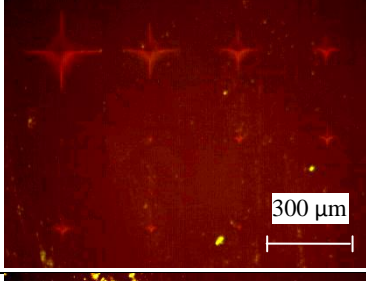
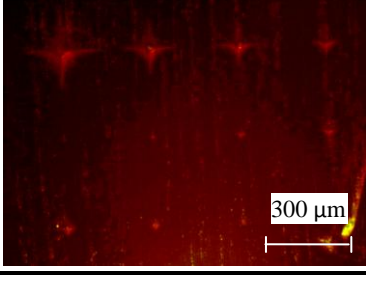
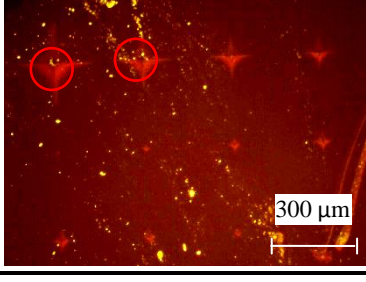
No que diz respeito à suspensão de bactérias negativas, os resultados ainda se revelaram mais fracos pois após 0,5, 1, 2, 3 e 4 minutos de penetração e aderência não foi possível verificar a presença de bactérias em nenhum dos defeitos. Apenas no ensaio de 5 minutos se observou a presença de bactérias até ao defeito de 212,5 μm . Sendo este o único tempo em que se encontraram bactérias nos defeitos, faz com que se considere como o tempo óptimo para a suspensão de bactérias negativas no caso da amostra de PMMA.

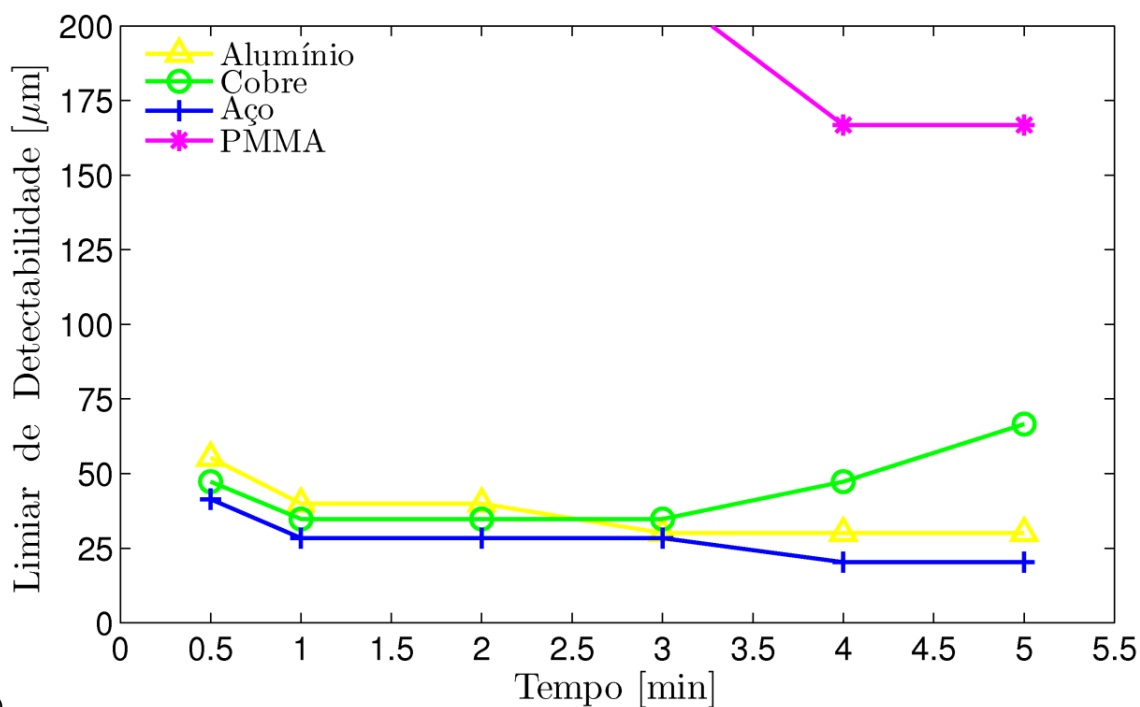
Em algumas das imagens da Tabela 6.8 verifica-se a presença de alguns riscos de suspensão bacteriana na superfície da amostra de PMMA, em consequência de uma limpeza mais suave da superfície na etapa de remoção de excesso.

Os vários ensaios para a amostra de PMMA foram bastante fracos, em virtude de terem sido poucos os tempos em que se conseguiram ter bactérias presentes nos defeitos produzidos, e mesmo nesses ensaios, a concentração destas era mínima.

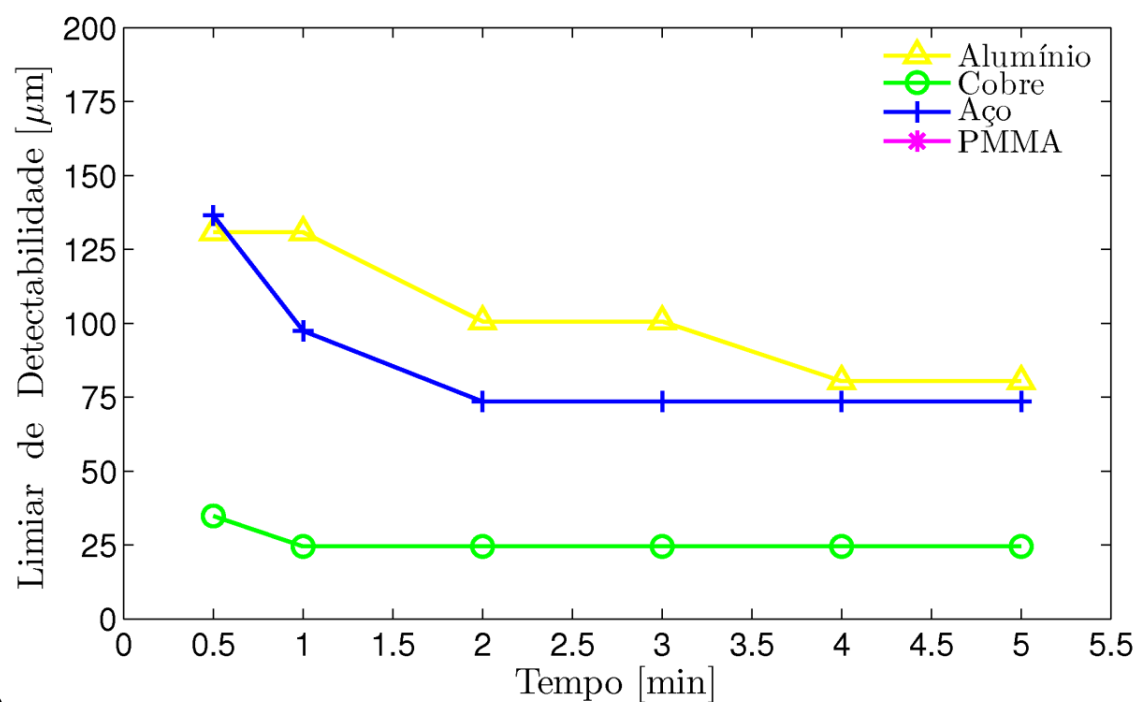
Parte do que foi escrito para as imagens das Tabelas 6.5, 6.6, 6.7 e 6.8 fica mais claro com a observação dos gráficos da Figura 6.25 em que se mostra o limiar de detectabilidade para cada tempo de cada ensaio e para cada tipo de suspensão bacteriana, nas diferentes amostras de material produzidas. Assim, verificou-se que foi para o aço que se conseguiu o limiar de detectabilidade até uma dimensão mais reduzida, isto é, observou-se a presença de bactérias até defeitos da ordem dos 20,3 μm , para quando se utiliza uma suspensão de bactérias com carga superficial positiva. Seguiu-se a suspensão de bactérias com carga superficial negativa no cobre com um limiar de detectabilidade de 24,5 μm e a suspensão de bactérias positivas no alumínio em que se conseguiu atingir um limiar de detectabilidade de 30,1 μm . Já em sentido oposto, tiveram-se os piores limiares de detectabilidade para ambas as suspensões de bactérias no caso do PMMA. Tirando os ensaios com a amostra de cobre, verificou-se que com o aumento da duração para o tempo de penetração e aderência, existiu para todos os outros materiais ensaiados a tendência de ir aumentando o valor do limiar de detectabilidade.

Tabela 6.8 – Comparação entre a suspensão de bactérias positivas e negativas para os vários tempos na amostra de PMMA

Amostra de PMMA		
Tempo (minutos)	Positivas	Negativas
0,5		
1		
2		
3		
4		
5		



a)



b)

Figura 6.25 – Evolução do limiar de detectabilidade com o tempo para a suspensão de bactérias: a) Positivas, b) Negativas

Na Tabela 6.9 podem comparar-se a suspensão de bactérias positivas e a suspensão de bactérias negativas, para os vários materiais, tendo sido escolhido para esta comparação o tempo óptimo obtido para cada suspensão em cada material, na etapa de penetração e aderência.

Assim, para o aço utilizou-se o tempo de 4 minutos de penetração e aderência para a suspensão de bactérias positivas, enquanto que para a suspensão de bactérias negativas utilizou-se o tempo de 2 minutos. Observando a imagem da suspensão de bactérias positivas comparativamente com a da suspensão de bactérias negativas da Tabela 6.9, rapidamente se verifica que existe uma maior presença das bactérias nos defeitos quando se tem a suspensão de bactérias positivas, logo para o aço é claramente preferível a utilização desta suspensão para ensaios futuros.

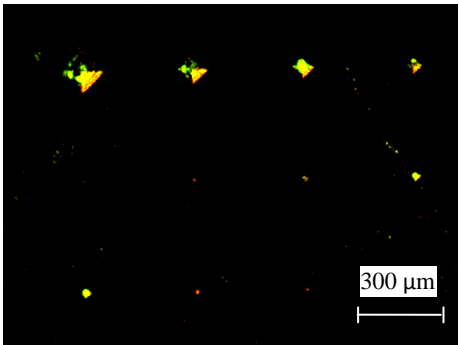
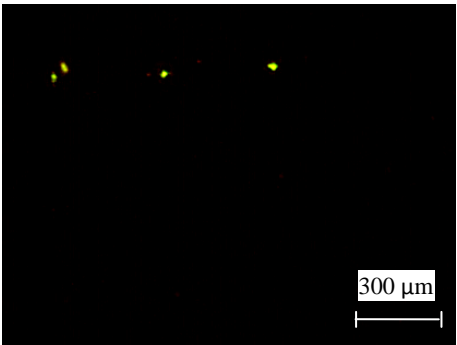
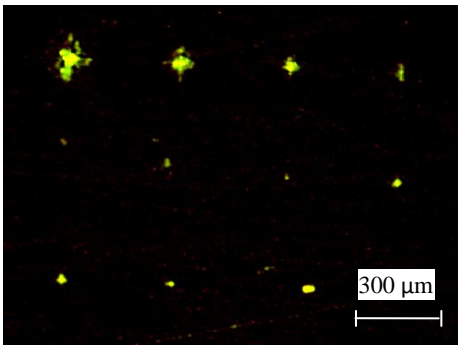
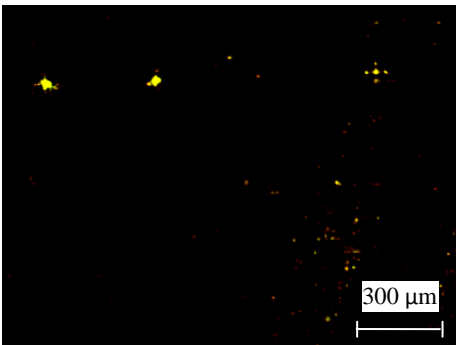
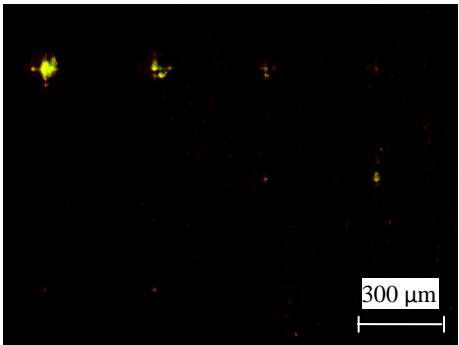
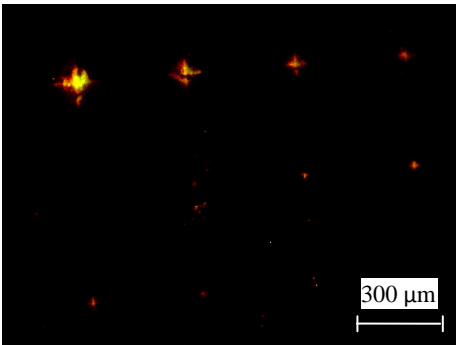
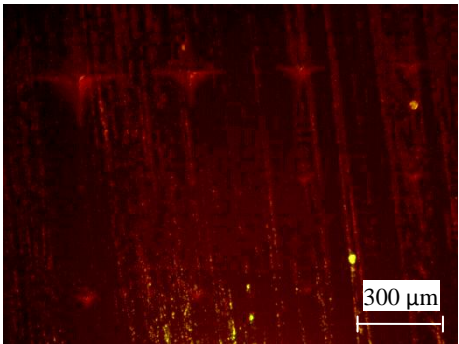
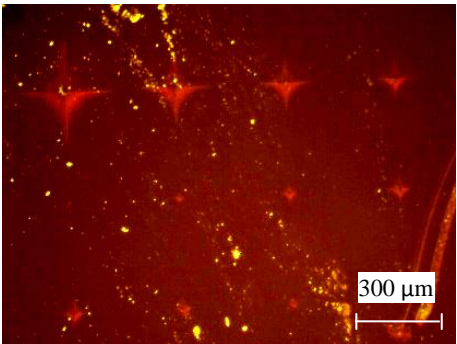
No caso do alumínio utilizou-se o tempo de 4 minutos de penetração e aderência das células à superfície para ambas as suspensões de bactérias (positivas e negativas). Pela análise da imagem da suspensão de bactérias positivas e da suspensão de bactérias negativas da Tabela 6.9, verifica-se uma maior presença de bactérias e em maior número de defeitos, por parte da suspensão de bactérias positivas. Assim considera-se que esta é a melhor suspensão a utilizar em ensaios a realizar futuramente.

Para a amostra de cobre, verificou-se que o tempo óptimo de penetração e aderência das células bacterianas com a superfície para a suspensão de bactérias positivas e negativas foi exactamente o mesmo e de 3 minutos. Assim, pela análise das imagens da Tabela 6.9, constata-se uma ligeira superioridade por parte da suspensão de bactérias negativas, pois estas conseguem penetrar até um defeito de dimensões mais reduzidas. Em ambas as suspensões a concentração de bactérias nos defeitos não é elevada.

Relativamente à amostra de PMMA, verificou-se que esta era aquela que proporcionava resultados mais fracos após a etapa de remoção de excesso, existindo mesmo vários ensaios em que não se consegue mesmo a presença de bactérias nos defeitos depois desta etapa. Tendo sido de 4 minutos o tempo óptimo de penetração e aderência para a suspensão de bactérias positivas e de 5 minutos para as negativas, verificou-se uma ligeira superioridade por parte da suspensão de bactérias positivas em virtude de uma ligeira presença em maior número de bactérias em defeitos.

Comparando os quatro materiais ensaiados, pode concluir-se que a suspensão de bactérias positivas é a que melhores resultados produziu (com excepção do cobre), ou seja, é aquela que permite para o mesmo material detectar a presença de defeitos mais pequenos.

Tabela 6.9 – Comparativo entre bactérias positivas e negativas para as diversas amostras, utilizando o tempo
ótimo de penetração e aderência destas

Material	Bactérias positivas	Bactérias negativas
Aço		
Alumínio		
Cobre		
PMMA		

6.5. Fase de revelação dos defeitos das amostras

Neste estudo pretendeu avaliar-se a possibilidade de favorecer o crescimento das células bacterianas que se encontravam dentro dos defeitos de forma a que a colónia formada pudesse ser identificada a olho nu.

Após a deposição com uma pipeta de uma gota da suspensão bacteriana que produziu melhores resultados nos testes anteriores sobre as matrizes de defeitos nas quatro amostras de materiais diferentes, utilizou-se o tempo óptimo para penetração e aderência de cada material. Assim, esperaram-se 3 minutos para a amostra cobre (com suspensão de bactérias negativas) e 4 minutos para as amostras de aço (com suspensão de bactérias positivas), de alumínio (com suspensão de bactérias positivas) e de PMMA (com suspensão de bactérias positivas).

6.5.1 Crescimento com a Fonte de Carbono Adequada ao Tipo de Carga da Suspensão Bacteriana Pretendido

Passado o tempo de penetração e aderência e a consequente remoção de excesso, colocaram-se as amostras em quatro tubos falcon de 50ml, contendo no seu interior 12,5 mL de meio mineral de crescimento. No caso do cobre esse meio mineral continha 0.25% (v/v) de etanol absoluto para que as células crescessem com carga superficial negativa. No caso das amostras de alumínio, aço e PMMA o meio mineral continha 0,25% (v/v) de *n*-hexadecano para que as células ficassem com carga superficial positiva. Na Figura 6.26 podem ver-se as quatro amostras colocadas nos tubos falcon, com o respectivo meio de cultura, antes de serem colocadas no incubador que manteve as condições de crescimento a 200 rpm e a 28 °C.



Figura 6.26 – Amostras colocadas nos tubos Falcon prontas para a etapa de revelação

Uma vez que os corantes fluorescentes utilizados ligam-se a moléculas de DNA, não foi adicionado qualquer corante durante este ensaio (nem para confirmar se havia células aderidas aos defeitos antes da incubação) para permitir o crescimento celular e a formação de colónias de bactérias.

Nas Tabelas 6.10 e 6.11, estão representadas várias imagens captadas para três tempos distintos em que foi efectuado o controlo da evolução do crescimento das bactérias para cada amostra. Na Tabela 6.10 as imagens foram captadas ao microscópio, enquanto que as presentes na Tabela 6.11 estas foram captadas com uma máquina fotográfica digital.

Após uma incubação de 17h no caso da amostra de aço e pela análise da Tabela 6.10, verificou-se que existiu um pequeno crescimento bacteriano na zona dos defeitos, mas também se foram observando bactérias ao longo da superfície da amostra, sendo estas resultantes do crescimento de bactérias que tenham ficado em pequenos defeitos existentes na superfície da amostra resultantes das lixas de polimento. Da Tabela 6.11 verifica-se pela foto com a máquina fotográfica que para este mesmo tempo no aço ainda não se conseguem visualizar colónias de bactérias a olho nu, sendo possível apenas começar a notar o aparecimento de manchas à superfície e o desaparecimento do brilho típico de uma superfície de aço polida.

Para um tempo de crescimento de 24h, não se verificou muita diferença comparativamente com o tempo de 17h, como é visível nas imagens da Tabela 6.10. No entanto, quando se olha para a Tabela 6.11, já é possível verificar diferenças para estes tempos de revelação, visto que, para 24h já existem sinais claros de corrosão à superfície da amostra de aço.

Para o tempo de 89h de incubação verificou-se pela imagem da Tabela 6.10, a existência de um grande aglomerado de bactérias, sobrepondo-se desta forma aos defeitos da matriz, não sendo por isso possível observar os defeitos na imagem ao microscópio. Para este tempo verificou-se pela foto da Tabela 6.11, uma amostra de aço em elevado estado de corrosão, sendo possível visualizar pequenas colónias de bactérias dispersas pela superfície da amostra.

Em virtude dos níveis elevados de corrosão apresentados para as várias amostras ensaiadas de aço, este deve ser um material que não deve utilizar a etapa de revelação ou os tempos de revelação utilizados deverão ser os menores possíveis para este meio de crescimento com a fonte de carbono de hexadecano.

Para a amostra de alumínio e pela análise da Tabela 6.10, verificou-se que para os tempos de incubação de 17h e 24h não existe uma diferença substancial no que diz respeito à concentração de bactérias nos defeitos, visualizando-se a presença de bactérias, embora em número bastante reduzido na superfície da amostra. No caso das 89h de incubação verificou-se a existência de aglomerados de bactérias quer nos defeitos, quer em algumas zonas da superfície.

Pela Tabela 6.11, verificou-se que no caso do alumínio não foi possível visualizar a existência de colónias de bactérias a olho nu para os tempos de crescimento de 17h e 24h. Para o tempo de 89h

verificou-se já um enorme aglomerado de bactérias sobre o lado direito da amostra, mas esse aglomerado era independente dos defeitos, pois não permitia evidenciar os defeitos produzidos uma vez que tinha uma forma uniforme e plana, não se vendo qualquer forma piramidal típica dos defeitos.

Para a amostra de cobre teve-se mais um comprovativo das propriedades anti-bacterianas deste material, pois como é visível para as imagens da Tabela 6.10 verificou-se uma tendência decrescente na presença de bactérias nos defeitos. Assim para uma incubação de 17h já existia uma menor concentração de bactérias nos defeitos comparativamente com o tempo inicial antes de pôr a revelar, ou seja, para 0h, existindo só algumas bactérias nos defeitos maiores. Para 24h de incubação verificou-se novamente um decrescer de bactérias nos defeitos e para as 89h verificou-se que não existiam bactérias em nenhum dos defeitos.

Uma maneira simples de comprovar o sucessivo decrescimento da concentração de bactérias nos defeitos pode ser feita pela observação da Figura 6.27. Assim para a Figura 6.27 a) podem observar-se vários pontos azuis no interior dos defeitos, encontrando-se mesmo ainda em alguns defeitos de menor dimensão, significando isto que se encontram bactérias no interior destes. Já para a Figura 6.27 b), verifica-se a presença de pontinhos azuis apenas nos defeitos de maior dimensão, ao passo que na Figura 6.27 c) já não se assiste à presença dos pontinhos azuis, indicadores da presença de bactérias, em nenhum dos defeitos.

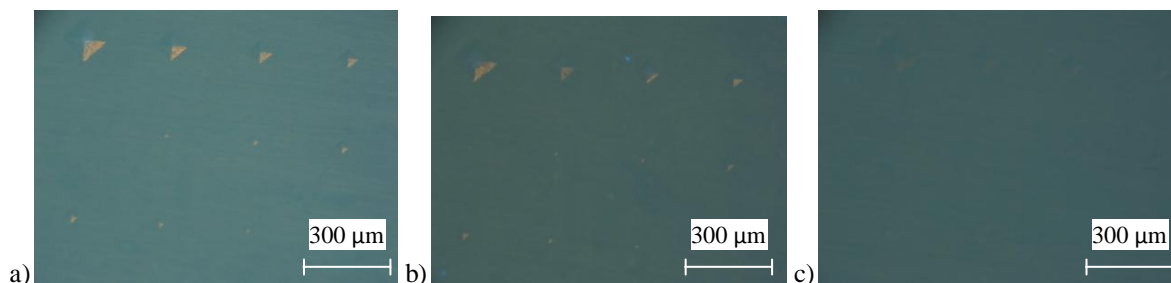


Figura 6.27 - Imagens para a amostra de cobre, captadas ao microscópio utilizando o filtro U-MWU, para os tempos de revelação: a) 17h, b) 24h e c) 89h

Pela análise da Tabela 6.12 verificou-se que para nenhum dos tempos de crescimento para o cobre, ou seja, para 17h, 24h e 89h foi possível visualizar a olho nu colónias de bactérias a sinalizar os defeitos. Isto poderia ser esperado dadas as propriedades anti-bacterianas do cobre: as células perderam viabilidade e não conseguiram formar colónias na sua superfície.

No caso da amostra de PMMA, e pela observação das Tabelas 6.10 e 6.11, confirmaram-se os fracos resultados relativamente ao crescimento de colónias de bactérias nos defeitos, em virtude das poucas bactérias presentes nos defeitos após a etapa de remoção de excesso. Assim, para 17h e 24h continuavam a ser praticamente nulas as células bacterianas visíveis, enquanto que para 89h já

existiam umas pequenas colónias de bactérias nos defeitos maiores e algumas outras espalhadas pela superfície da amostra. Pela Tabela 6.11, verificou-se facilmente que a olho nu não foi de todo visível a presença de colónias de bactérias identificativas dos defeitos para os vários tempos de revelação ensaiados.

Pelo que se pode observar nas Tabelas 6.10 e 6.11 a etapa da revelação para o meio de crescimento utilizado (etanol no cobre e hexadecano no aço, alumínio e PMMA) acabou por não se traduzir nos resultados pretendidos, uma vez que não se verificou um crescimento substancial de bactérias na zona dos defeitos de modo a formar grandes colónias de bactérias, que possam tornar possível a visualização dos defeitos a olho nu. No caso do aço houve um enorme crescimento, principalmente para 89h, mas para além das colónias de bactérias se encontrarem espalhadas por toda a superfície da amostra, acabou por acontecer a corrosão da superfície. O alumínio acabou por ser a amostra que teve uma melhor etapa de revelação para este meio de crescimento utilizado, em virtude do crescimento em número já de certo modo significativo de colónias de bactérias nos defeitos, principalmente para as 89h de incubação. Já no caso do cobre as bactérias foram desaparecendo da amostra com o passar do tempo de incubação, não se considerando por isso nenhum dos tempos testados para tempo óptimo de revelação. A amostra de PMMA conseguiu pequenas colónias de apenas para um tempo de incubação de 89h, não se podendo por isso falar em tempo óptimo de revelação para esta amostra.

Estudos mais detalhados terão de ser efectuados para determinar a composição do melhor meio de crescimento, a fonte de carbono e condições ideais para favorecer o desenvolvimento de colónias de bactérias a partir das que inicialmente se colocam nos defeitos.

Tabela 6.10 - Comparativo para os vários tempos de revelação ensaiados para os diversos materiais sendo estas imagens captadas ao microscópio

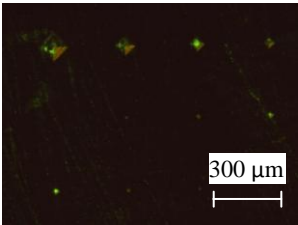
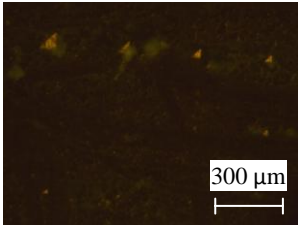
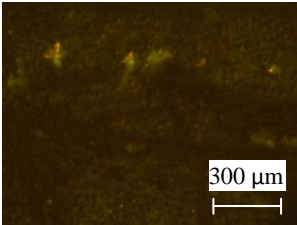
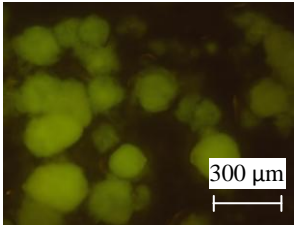
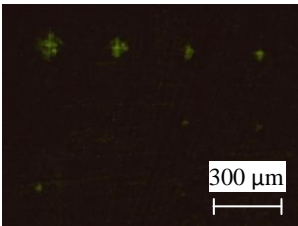
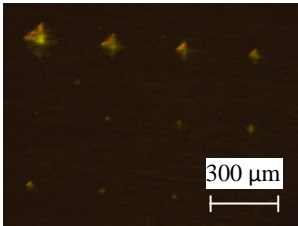
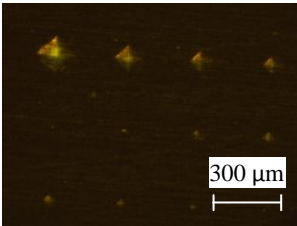
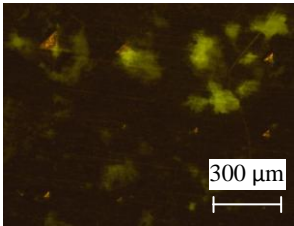
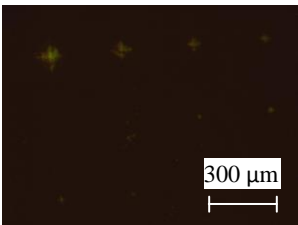
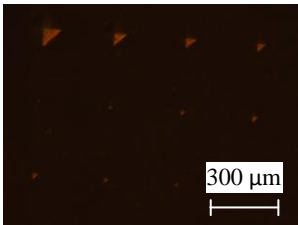
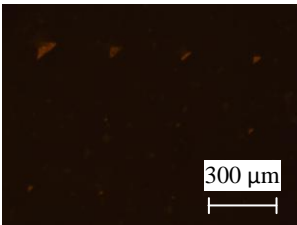
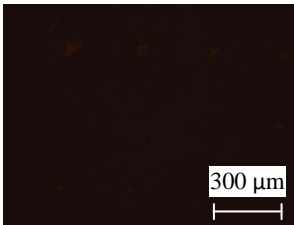
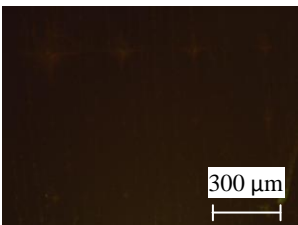
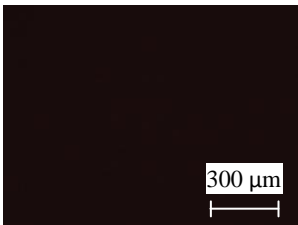
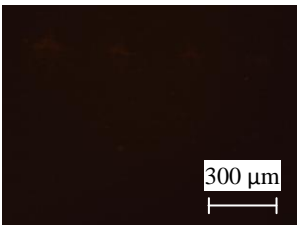
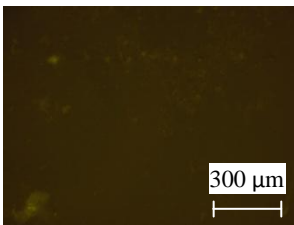
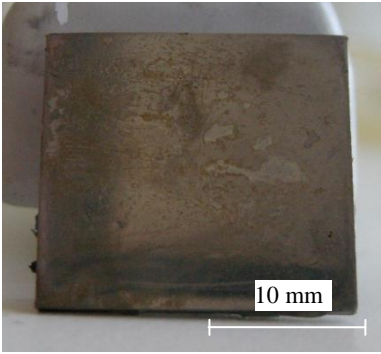
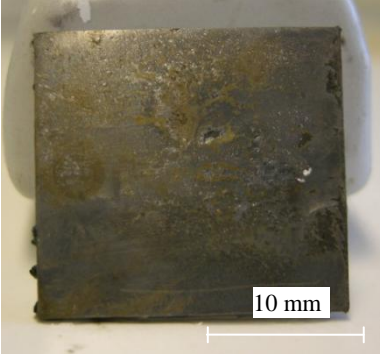
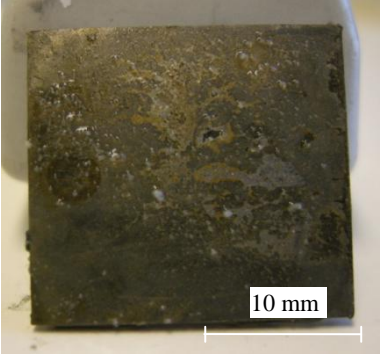
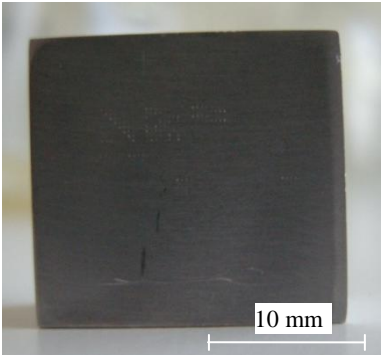
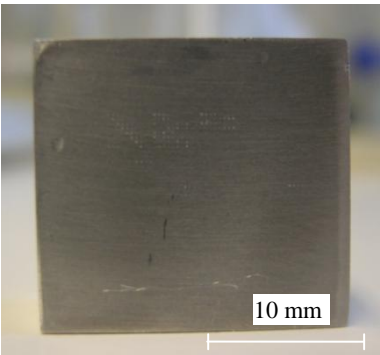
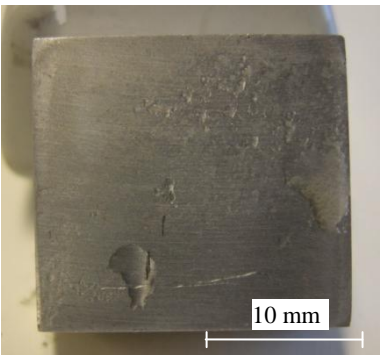
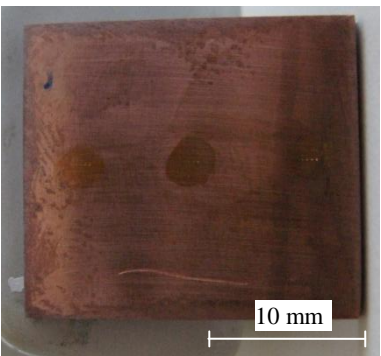
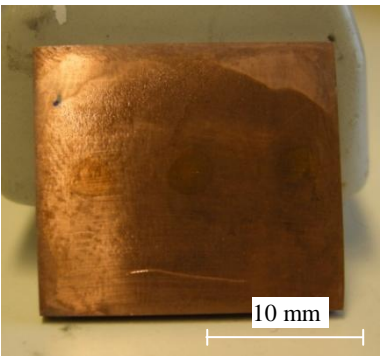
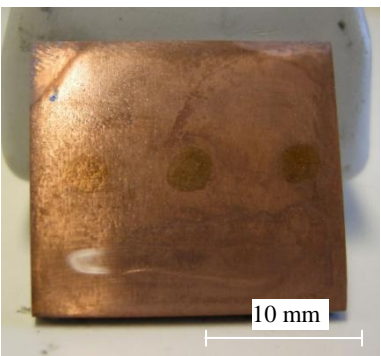
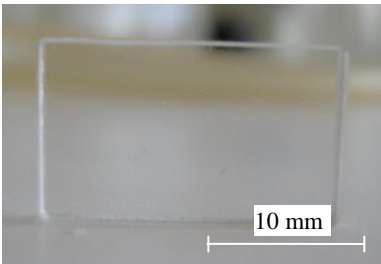
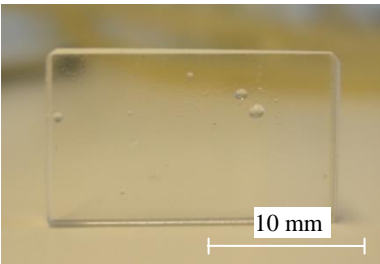
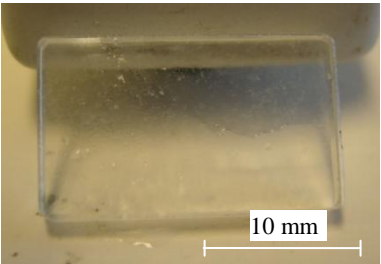
Mat	Tempo de revelação (horas)			
	0h	17h	24h	89h
Aço				
Al				
Cu				
PM MA				

Tabela 6.11 - Comparativo para os vários tempos de revelação ensaiados para os diversos materiais sendo estas imagens captadas com máquina fotográfica

Mat.	Tempo de revelação (horas)		
	17h	24h	89h
Aço			
Al			
Cu			
PMMA			

6.5.2 Crescimento com Etanol como Fonte de Carbono

Decorrido o tempo de penetração e aderência e a etapa de remoção de excesso, colocaram-se as amostras em quatro tubos falcon de 50ml, contendo no seu interior 12,5 mL de meio mineral de crescimento que continha 0.25% (v/v) de etanol absoluto, colocando-se de seguida cada uma das quatro amostras (cobre, alumínio, aço e PMMA) no respectivo tubo falcon. De seguida, os tubos falcon com o respectivo meio de cultura, foram colocados num incubador a 200 rpm e a 28 °C.

Devido às bactérias crescerem com etanol como fonte de carbono, faz com que estas acabem por adquirir carga negativa à superfície como é hábito nas bactérias.

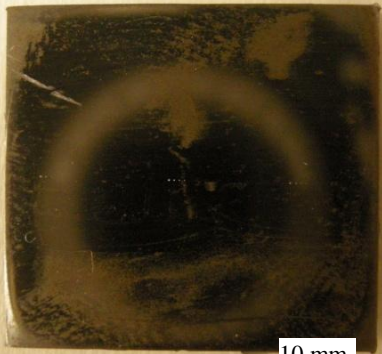
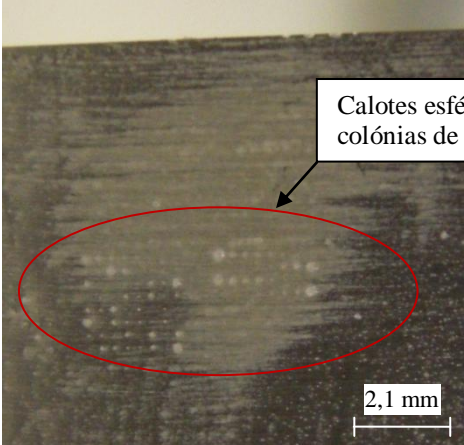
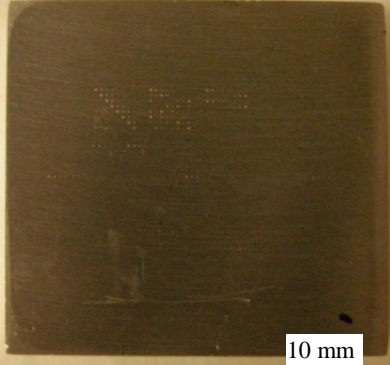
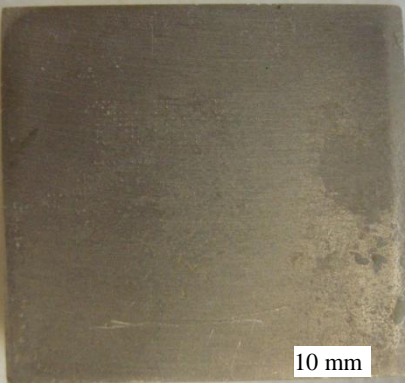
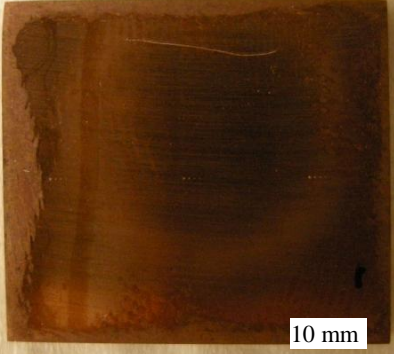
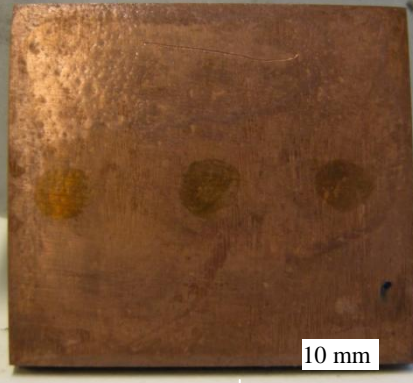
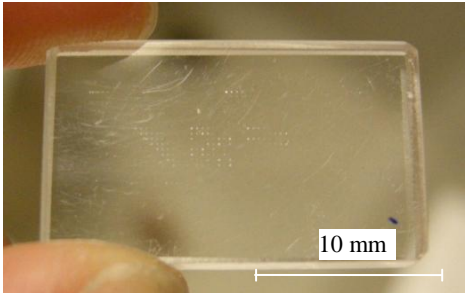
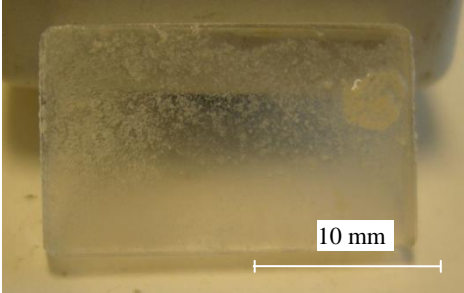
Na Tabela 6.12 apresenta-se um comparativo entre fotografias, captadas por uma máquina fotográfica digital, no momento antes da deposição da suspensão bacteriana e para o momento após uma incubação de 24h.

No caso da amostra de aço conseguiu-se uma verdadeira revelação para o tempo de 24h de incubação pois, passado esse período de tempo foi possível visualizar a olho nu grande parte dos defeitos produzidos por indentação das matrizes aleatória e alternada. Isto ficou a dever-se ao crescimento de colónias de bactérias que se encontravam na zona nos defeitos após a etapa de remoção de excesso. Assim foram visíveis colónias de bactérias até ao defeito de 20,3 µm. Verificou-se também o crescimento de colónias de bactérias alinhadas com os riscos à superfície resultante do processo de polimento. As colónias nos defeitos apresentam a forma de pequenas calotes esféricas no caso dos defeitos de indentação e de alinhamentos de colónias de bactérias no caso dos riscos de polimento.

Comparativamente ao crescimento que tinha sido efectuado em hexadecano, verificou-se um grande melhoramento de resultados, visto que, para essa revelação tinha sido fraco o crescimento de bactérias, sendo que as poucas colónias de bactérias formadas se encontravam espalhadas pela superfície da amostra e não concentradas na zona de defeitos como se verificou após crescimento em etanol. No entanto, acabou por se verificar novamente o fenómeno de biocorrosão na amostra de aço.

Já relativamente às restantes amostras de materiais ensaiados (alumínio, cobre e PMMA), não se verificou o crescimento de colónias de bactérias nas zonas específicas dos defeitos, não contribuindo por isto esta etapa de revelação (com crescimento em etanol como fonte de carbono) para evidenciar os defeitos nestas amostras, algo que também já se tinha verificado para a revelação em hexadecano.

Tabela 6.12 – Comparativo entre as fotos antes do início dos ensaios e depois de 24h de crescimento em etanol

Material	Defeitos (amostra antes dos ensaios)	24h de Revelação
Aço		
Alumínio		
Cobre		
PMMA		

6.6. Biocorrosão na Amostra de Aço

Pela observação das imagens da Tabela 6.11, ficou bem patente o fenómeno de biocorrosão que aconteceu na amostra de aço, já abordado na revisão bibliográfica. Com o passar do tempo de revelação a amostra ia ficando cada vez mais corroída, apresentando a sua superfície um aspecto cada vez mais degradado. Assim verificou-se que o contacto das células bacterianas com a superfície do aço leva à corrosão desta, por processos diversos, tais como reacções electroquímicas e reacções redox.

Na Figura 6.28 pode observar-se o estado da superfície da amostra de aço para cerca de uma semana após a realização dos ensaios com as suspensões bacterianas, apresentando-se a superfície repleta de “poros”. Devido ao elevado estado de corrosão torna-se impossível distinguir alguns dos defeitos mais reduzidos produzidos, com os “poros” que entretanto foram aparecendo.

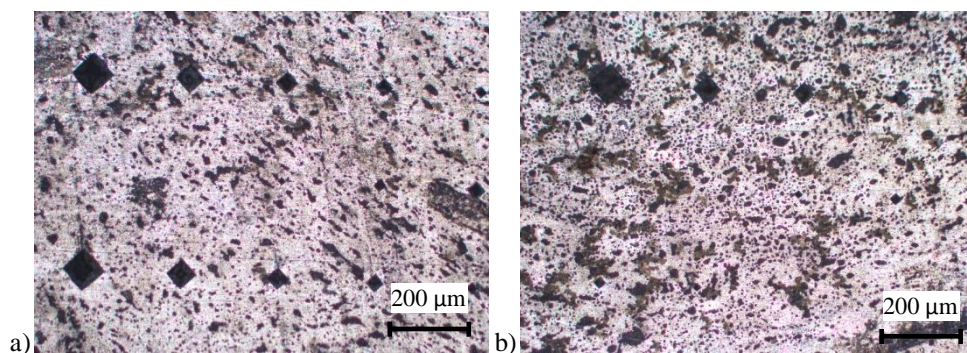


Figura 6.28 – Fotomicrografia da superfície da amostra de aço para: a) matriz alternada; b) matriz reduzida

7. Conclusões

O trabalho realizado pretendeu desenvolver uma técnica inovadora de END baseada na adesão de células bacterianas a defeitos produzidos em superfícies de diferentes materiais. Pode ser aplicada em praticamente todos os tipos de materiais não porosos, sendo que a sua principal aplicabilidade deverá ser na indústria de microfabricação e a outro tipo de indústrias em que seja relevante identificar micro-defeitos.

Foi possível verificar uma das considerações básicas desta técnica de END, a de que as bactérias ficam preferencialmente alojadas nos defeitos de superfície.

Relativamente aos campos magnéticos e eléctricos experimentados, verificou-se que os parâmetros utilizados não produziram os efeitos desejados de movimentação da suspensão de bactérias colocada sobre a amostra de material ensaiada, de modo a facilitar a penetração desta nos defeitos produzidos. No caso do PMMA e dos ensaios que se fizeram na lamela de vidro foi possível verificar pequenas movimentações bruscas das bactérias apenas quando se ligava e desligava a fonte de tensão. Estas movimentações eram maiores para a suspensão de bactérias negativas, comparativamente com a suspensão de bactérias positivas. Já para o alumínio e o aço, não se verificou qualquer tipo de movimentação, quer quando se ligava e desligava a fonte de tensão, quer quando se mantinha esta ligada e se ia variando a tensão emitida pela fonte de tensão.

Relativamente aos primeiros ensaios efectuados em que se utilizou um gerador de sinais ligado a uma bobina de ignição, não se conseguiu visualizar nenhum tipo de movimentação na suspensão colocada sobre a amostra ensaiada, devida aos campos eléctricos produzidos.

Uma possível razão para a não movimentação das bactérias pode estar relacionada com o facto de a força de atrito provocado pelo fluido bacteriano em que estas se encontram, ser maior que a força eléctrica produzida pelo campo eléctrico. Outra possível explicação pode ser que a carga eléctrica que as bactérias adquirem após o crescimento na fonte de carbono adequada, seja reduzida fazendo com que estas não sejam sensíveis ao campo eléctrico produzido.

No caso das várias amostras ensaiadas (com excepção do cobre) verificou-se sempre uma tendência para o aumento da concentração de bactérias nos defeitos com o tempo utilizado na etapa de penetração e aderência, quer quando se utilizava a suspensão de bactérias positivas, quer para a suspensão de bactérias negativas. No caso do cobre existe uma curva de inversão na tendência da presença de bactérias nos defeitos com o tempo, visto que, nos minutos iniciais de teste havia uma tendência de crescimento do número de bactérias nos defeitos e com o avançar do tempo de penetração e aderência, começavam a observar-se menos bactérias nos defeitos, resultante das propriedades anti-bacterianas que o cobre possui sobre as bactérias.

Relativamente à etapa de penetração e aderência, verificou-se que para as amostras de aço e alumínio se obtiveram boas concentrações de bactérias nos defeitos após a etapa de remoção do excesso, sendo que para estes materiais se conseguiram melhores resultados nesta fase de ensaios. A amostra de cobre também evidenciou uma boa concentração de bactérias para os tempos de penetração e aderência ensaiados. Já na amostra de PMMA pelo contrário, foram poucas as bactérias que se encontravam presentes nos defeitos.

Fazendo uma análise comparativa entre as suspensões com bactérias positivas e negativas, verificaram-se sempre resultados melhores com a suspensão de bactérias positivas nos casos das amostras de alumínio, aço e PMMA. Já no caso do cobre os melhores resultados foram para a suspensão de bactérias negativas.

Os tempos óptimos de penetração e aderência para a suspensão de bactérias positivas foram de: 3 minutos para a amostra de cobre e 4 minutos para as amostras de aço, alumínio e PMMA. No caso da suspensão de bactérias negativas, os tempos óptimos foram de: 2 minutos para a amostra de aço, 3 minutos para a de cobre, 4 minutos para a de alumínio e 5 minutos para a de PMMA.

No que diz respeito ao limiar de detectabilidade verificou-se que foi para o aço que se conseguiu o limiar de detectabilidade até uma dimensão mais reduzida, isto é, de 20,3 μm , quando se utilizou a suspensão de bactérias positivas. Seguiu-se a suspensão de bactérias negativas no cobre com um limiar de detectabilidade de 24,5 μm e a suspensão de bactérias positivas no alumínio em que se conseguiu atingir um limiar de detectabilidade de 30,1 μm . Em sentido oposto, obteve-se o pior limiar de detectabilidade para a suspensão bacteriana negativa no caso do PMMA, que foi apenas de 212,5 μm . Exceptuando os ensaios com a amostra de cobre, verificou-se que o valor do limiar de detectabilidade aumenta com o tempo de penetração e aderência.

A técnica de END por LP pode conseguir detectar fissuras com uma dimensão inferior à detectada neste trabalho. No entanto, ainda existe um longo caminho a percorrer no sentido de avaliar e desenvolver muitos parâmetros de ensaio de modo a conseguir atingir defeitos cada vez mais pequenos (como por exemplo encontrar os parâmetros que permitam a utilização de campos eléctricos e magnéticos de modo a facilitar a penetração das bactérias nos defeitos).

No caso da etapa de revelação da amostra de aço em que as células foram colocadas em crescimento com uma fonte de carbono de etanol, foi possível verificar a olho nu o crescimento de colónias de bactérias nas zonas de defeitos piramidais, atingindo-se claramente o que é pretendido para esta etapa. Assim, foi possível verificar a olho nu a existência de calotes esféricas desde o defeito maior até ao defeito de 20,3 μm . Foi ainda possível visualizar a olho nu o crescimento de colónias de bactérias no alinhamento dos riscos de polimento.

No entanto, pelos vários testes efectuados verificou-se que a etapa da revelação, onde se pretendia que as células aderidas aos defeitos crescessem até formar uma colónia visível a olho nu,

acabou por não se traduzir nos resultados pretendidos (com exceção de células que cresceram em etanol como fonte de carbono na amostra de aço), uma vez que não se verificou um crescimento substancial de bactérias na zona dos defeitos de modo a formar grandes colónias de bactérias, que pudessem tornar possível a visualização dos defeitos a olho nu.

A etapa de revelação pode ser prejudicial para o aço, uma vez que este é um material susceptível à biocorrosão.

Como conclusão final, pode dizer-se que foram dados alguns passos importantes para se iniciar o desenvolvimento mais profundo desta técnica de END em filmes de células bacterianas: verificou-se qual o tipo de suspensão bacteriana que produz melhores resultados; determinou-se qual o melhor tempo de penetração e aderência para cada material; descobriram-se algumas incompatibilidades com materiais.

8. Propostas para desenvolvimentos futuros

Terminado este trabalho, importa indicar vários tipos de propostas, para depois vir a realizar num fase futura de modo a complementar este trabalho realizado e continuar a desenvolver esta técnica inovadora de END em filmes de células bacterianas.

Esta técnica de END deve ser testada e analisada para outros tipos de defeitos que não sejam os piramidais, como por exemplo defeitos produzidos por electro-erosão e por diferentes granulometrias de lixa de polimento / acabamento. Assim testando vários tipos de defeito é possível verificar qual a morfologia a que esta técnica mais se adequa e produz melhores resultados.

Durante esta tese praticamente não se testou a aplicação dos campos magnéticos, tendo sido basicamente construídos os dispositivos para a aplicação dos campos magnéticos, pelo que se deve avaliar futuramente a aplicabilidade dos campos eléctricos a esta técnica de END.

Devem ser estudados e procurados novos parâmetros para aplicar às placas de campo eléctrico, de modo a que se possa conseguir obter um campo eléctrico que possibilite a movimentação da suspensão bacteriana e com isto facilitar a penetração das bactérias nos defeitos do material a analisar.

As metodologias desenvolvidas para a aplicação desta técnica de END devem ser testadas e analisadas para outras espécies de bactérias diferentes de modo a encontrar uma espécie óptima para cada material, defeito a analisar, tempo necessário para detectar os defeitos, entre outros parâmetros importantes. Encontrar também um tipo de bactéria que não provoque biocorrosão no aço e outro tipo de bactéria que seja resistente às propriedades anti-bacterianas que o cobre revela.

A etapa de revelação deve ser sujeita a maiores estudos de modo a que se possam ter resultados mais desejáveis com o que se pretende desta etapa, nomeadamente que as células que se encontram em cada um dos defeitos cresçam (isto é, multipliquem-se pois em biotecnologia crescer é aumentar o número de células) até que se formem colónias visíveis a olho nu para facilitar a detecção dos defeitos.

A biocorrosão no aço pode vir a ser utilizada como um novo método para a produção de defeitos com dimensão e morfologia variável.

Em virtude de falta de tempo para cumprir um dos objectivos, deverá ser efectuada numa fase futura a avaliação experimental da inadequação das técnicas de END já existentes, na detecção de micro-defeitos superficiais em materiais de engenharia sujeitos a processos tecnológicos.

Referências Bibliográficas

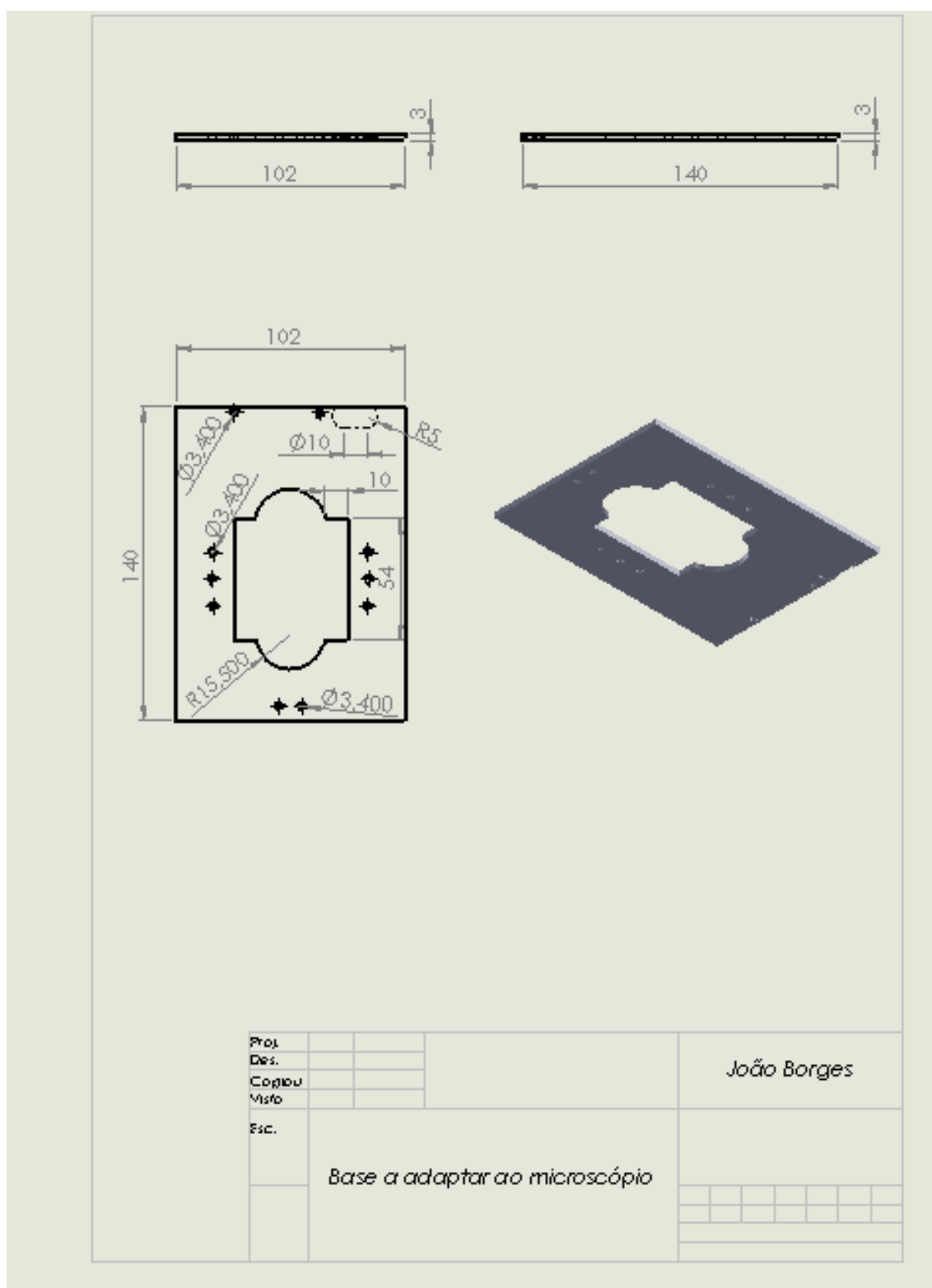
- [1] *Disciplina de Tecnologia Mecânica IV*, disponível em: <<http://moodle.fct.unl.pt/course/view.php?id=2575>>. Acesso em Janeiro de 2011
- [2] *Infofest*, disponível em: <<http://www.sedivirta.net/website/index.php/movie/568-10-desastres-mais-caros-da-historia.html>>, Acesso em Janeiro de 2011
- [3] *Big Game Clube – Portugal*, disponível em: <http://www.biggameclube-portugal.com/index.php?option=com_content&task=blogcategory&id=0&Itemid=146&limit=20&limitstart=200>. Acesso em Janeiro de 2011
- [4] *Pegadas*, disponível em: <<http://www.pegadasdocotidiano.com/2011/06/de-domingo-para-segunda-instituto-ayrton.html>>. Acesso em Janeiro de 2011
- [5] Wendell Karlos Tomazelli Coltro, Evandro Piccin, Emanuel Carrilho, Dosil Pereira de Jesus, José Alberto Fracassi da Silva, Heron Domingues Torres da Silva e Claudimir Lúcio do Lago, “Microsistemas de Análises Químicas. Introdução, Tecnologias de Fabricação, Instrumentação e Aplicações”, Quim. Nova, Vol. 30, No. 8, 1986-2000, 2007
- [6] P. Hirsch, F.E.W. Eckhardt e R.J. Palmer Jr., “Methods for the study of rock-inhabiting microorganisms - A mini review”, Journal of Microbiological Methods, Vol. 23, 143-167, 1995
- [7] Robert J. Ross, James C. Ward e Anton TenWolde, “Identifying Bacterially Infected Oak by Stress Wave Nondestructive Evaluation”, United States Department of Agriculture, 1992
- [8] Elias Siores, Andrew S. Lamb, e Lee M. Swallow, “Bacterial Magnetic Particles for Applications in NDT&E, Detection of Flaws and Cracks in Sample Materials”, 17th World Conference on Nondestructive Testing, Shanghai, China, pp. 25-28, 2008
- [9] Ricardo Andreucci, *Ensaio Por Líquidos Penetrantes*, 1ª edição, 2001
- [10] Revista ABCM, número1, Vol. 9, Janeiro – Março de 2003
- [11] Gilmar Ferreira Batalha, Renato Luiz Lehnert Portela Cerveira, Flavia Renata Dantas Alves Silva, “Simulação de processos de microfabricação: influência do efeito de escala”
- [12] Resnick Robert, Halliday David e Walker Jearl, *Fundamentos de Física 3 – Electromagnetismo*, LTC Editora, 4ª ed.
- [13] *Portal São Francisco*, disponível em: <<http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/carga-eletrica/carga-eletrica.php>>. Acesso em Fevereiro de 2011
- [14] *Wikipédia*, disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Campo_el%C3%A9trico>. Acesso em Fevereiro de 2011
- [15] *UNB*, disponível em: <<http://vsites.unb.br/iq/kleber/EaD/Eletromagnetismo/CapacitorPlano/CapacitorPlano.html>>. Acesso em Fevereiro de 2011
- [16] *Física e Vestibular*, disponível em: <http://www.fisicaevestibular.com.br/exe_elt_14.htm>. Acesso em Fevereiro de 2011
- [17] *Lembretes de Física*, disponível em: <http://lempel.pagesperso-orange.fr/rappels_physique_uk.htm>. Acesso em Fevereiro de 2011
- [18] Yuehuei H. An, Richard J. Friedman, “Concise Review of Mechanisms of Bacterial Adhesion to Biomaterial Surfaces”, Journal of Biomedical Materials Research, Vol. 43, pp. 338-348, 1998
- [19] Carla C. C. R. de Carvalho, “Biofilms: Recent Developments on an Old Battle”, Recent Patents on Biotechnology, Vol. 1, pp. 49-57, 2007
- [20] Gottenbos B, Busscher HJ, Van Der Mei HC e Nieuwenhuis P., “Pathogenesis and prevention of biomaterial centered infections”, J Mat Sci and Mat In Med, Vol. 13, pp. 717-22, 2002
- [21] Fux CA, Stoodley P, Hall-Stoodley L e Costerton JW, “Bacterial biofilms: a diagnostic and therapeutic challenge”, Expert Rev Anti-Infect Ther, Vol. 1, pp. 667–683, 2003
- [22] Cristian Picioreanu, Mark C.M. van Loosdrecht e Joseph J. Heijnen, “Modelling and Predicting Biofilm Structure”
- [23] Parsek MR e Tolker-Nielsen T, “Pattern formation in Pseudomonas aeruginosa biofilms”, Curr Opin Microbiol, Vol. 11, pp. 560-566, 2008
- [24] Christophe Bordi e Sophie de Bentzmann, “Hacking into bacterial biofilms: a new therapeutic Challenge”, Annals of Intensive Care, 2011
- [25] Carla C.C.R. de Carvalho e M. Manuela R. da Fonseca, “Preventing biofilm formation: promoting cell separation with terpenes”, Federation of European Microbiological Societies, Vol.3, pp. 406-413, 2007
- [26] Davey ME e O’Toole GA., “Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics”, Microbiol Mol Biol Rev, Vol. 64, pp. 847-867, 2000
- [27] Flemming H-C., “Biofilms and environmental protection”, Water Sci Technol, Vol. 27, pp. 1-10, 1993
- [28] J.W. Costerton, “Introduction to biofilm”, International Journal of Antimicrobial Agents, pp. 217-221, 1999
- [29] V. Lazarova e J. Manem, “Biofilm Characterization and Activity Analysis in Water and Wastewater Treatment”, Wat. Res., Vol. 29, pp. 2227-2245, 1995
- [30] Dinty J. Musk Jr. e Paul J. Hergenrother, “Chemical Countermeasures for the Control of Bacterial Biofilms:

- Effective Compounds and Promising Targets”, *Current Medicinal Chemistry*, Vol. 13, pp. 2163-2177, 2006
- [31] Marion-Ferey K, Pasmorey M, Stoodley P, Wilson S, Husson GP e Costerton JW, “Biofilm removal from silicone tubing: an assessment of the efficacy of dialysis machine decontamination procedures using an in vitro model”, *J Hosp Infect*, Vol. 53, pp. 64–71, 2003
- [32] Costerton JW, Stewart PS e Greenberg EP., “Bacterial bio-films: a common cause of persistent infections”, *Science*, Vol. 284, pp. 1318-22, 1999
- [33] Weitao T, “Multicellularity of a unicellular organism in response to DNA replication stress” *Res Microbiol*, Vol. 160, pp. 87-88, 2009
- [34] Hoyle BD e Costerton JW, “Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms”, *Prog Drug Res*, Vol. 37, pp. 91–105, 1991
- [35] Chen X & Stewart PS, “Biofilm removal caused by chemical treatments” *Water Res*, Vol. 34, pp. 4229–4233, 2000
- [36] Weigel LM, Donlan RM, Shin DH, Jensen B, Clark NC, McDougal LK, Zhu W, Musser KA, Thompson J, Kohlerschmidt D, Dumas N, Limberger RJ, Patel JB, “High-level vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with a polymicrobial biofilme” *Antimicrob Agents Chemother*, Vol. 51, pp.231-238, 2007
- [37] Hansen SK, Rainey PB, Haagensen JA, Molin S, “Evolution of species interactions in a biofilm community” *Nature*. Vol. 445, pp. 533-536, 2007
- [38] O’Toole G, Kaplan HB e Kolter R, “Biofilm formation as microbial development” *Annu Rev Microbiol*, Vol. 54, pp.49-79, 2000
- [39] Carla C.C.R. de Carvalho e Maria J. Caramujo, “Ancient Procedures for the High-Tech World: Health Benefits and Antimicrobial Compounds from the Mediterranean Empires”, *The Open Biotechnology Journal*, Vol. 2, pp. 235-246, 2008
- [40] A.L. Casey, D. Adams, T.J. Karpanen, P.A. Lambert, B.D. Cookson, P. Nightingale, L. Miruszenko, R. Shillam, P. Christian e T.S.J. Elliott, “Role of copper in reducing hospital environment contamination”, *Journal of Hospital Infection*, Vol. 74, pp. 72-77, 2010
- [41] J.O. Noyce, H. Michels e C.W. Keevil, “Potential use of copper surfaces to reduce survival of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the healthcare environment”, *Journal of Hospital Infection*, Vol. 63, pp. 289-297, 2006
- [42] Cristina Molteni, Helge K. Abicht e Marc Solioz, “Killing of Bacteria by Copper Surfaces Involves Dissolved Copper”, *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, pp. 4099–4101, 2010
- [43] H.T. Michels, J.O. Noyce e C.W. Keevil “Effects of temperature and humidity on the efficacy of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* challenged antimicrobial materials containing silver and copper”, *Letters in Applied Microbiology*, 2009
- [44] P. Airey e J. Verran, “Potential use of copper as a hygienic surface; problems associated with cumulative soiling and cleaning”, *Journal of Hospital Infection* , Vol. 67, pp. 271-277, 2007
- [45] *Environmental Protection Agency*, disponível em: <<http://www.epa.gov/pesticides/factsheets/copper-alloy-products.htm>>. Acesso em Março de 2011
- [46] Iwona B Beech e Jan Sunner, “Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals”, *Current Opinion in Biotechnology*, Vol. 15, pp.181-186, 2004
- [47] Hector A. Videla, “Prevention and control of biocorrosion”, *International Biodeterioration & Biodegradation*, Vol. 49, pp. 259 – 270, 2002
- [48] S.J. Yuan e S.O. Pehkonen, “Microbiologically influenced corrosion of 304 stainless steel by aerobic *Pseudomonas NCIMB 2021* bacteria: AFM and XPS study”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Vol. 59, pp. 87–99, 2007
- [49] N. Muthukumar, S. Maruthamuthu e N. Palaniswamy, “Water-soluble inhibitor on microbiologically influenced corrosion in diesel pipeline”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Vol. 53, pp. 260–270, 2006
- [50] Iwona B. Beech, “Corrosion of technical materials in the presence of biofilms—current understanding and state-of-the art methods of study”, *International Biodeterioration & Biodegradation*, Vol. 53, pp. 177 – 183, 2004
- [51] *Transport Canada*, disponível em: <<http://www.tc.gc.ca/eng/civilaviation/publications/tp185-1-06-maintenance-2997.htm>>. Acesso em Janeiro de 2011
- [52] William F. Smith, *Princípios de Ciência e Engenharia de Materiais*, McGRAW-HILL, 3ª Edição, 1998
- [53] de Carvalho, C.C.C.R., Wick, L.Y., Heipieper, H.J., “Cell wall adaptations of planktonic and biofilm *Rhodococcus erythropolis* cells to growth on C5 to C16 n-alkane hydrocarbons”, *Appl. Microbiol. Biotechnol*, Vol. 82, pp. 311-320, 2009

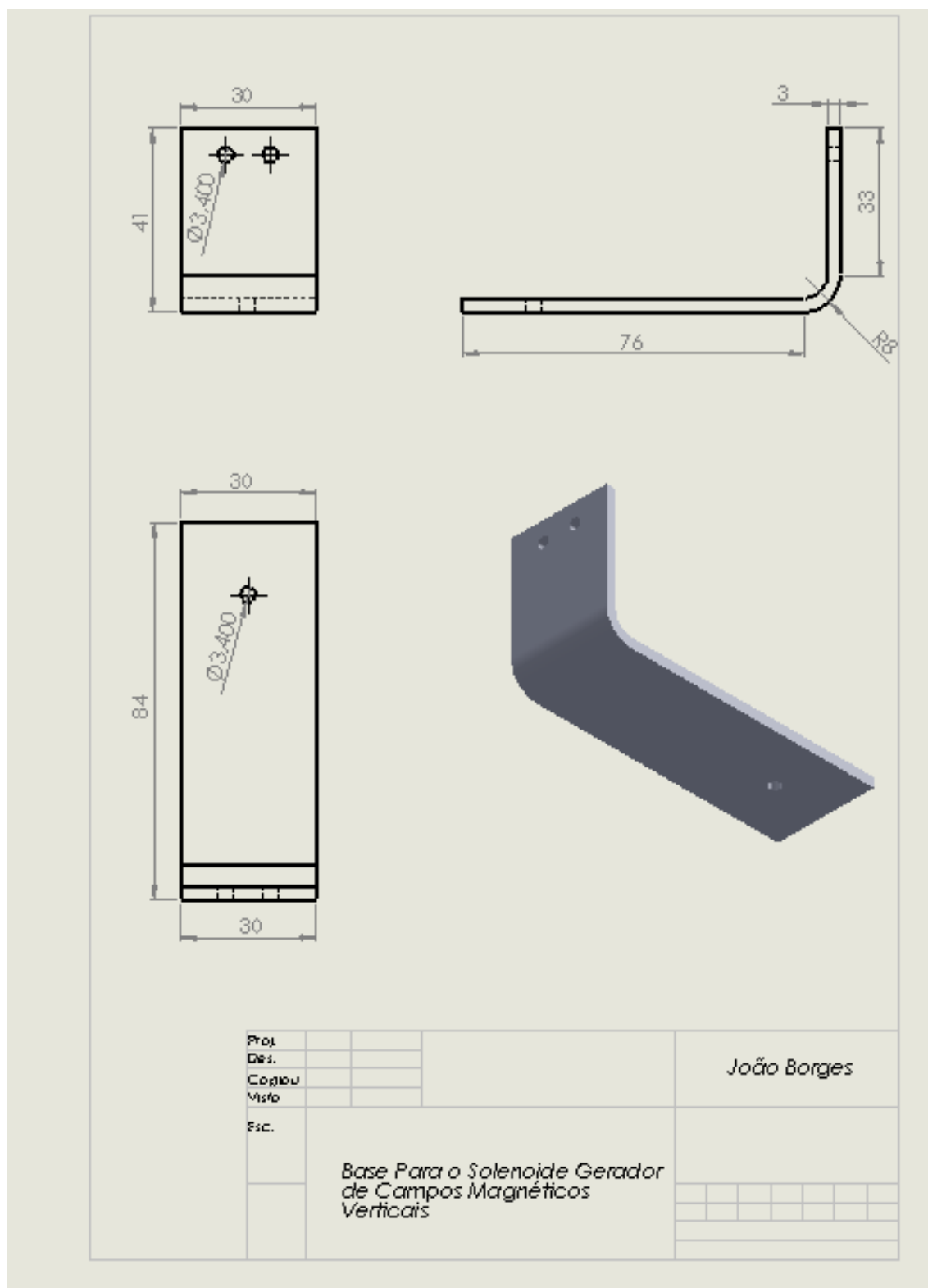
Anexos

A1 – Folhas de desenho em SolidWorks para os principais componentes a adaptar ao microscópio

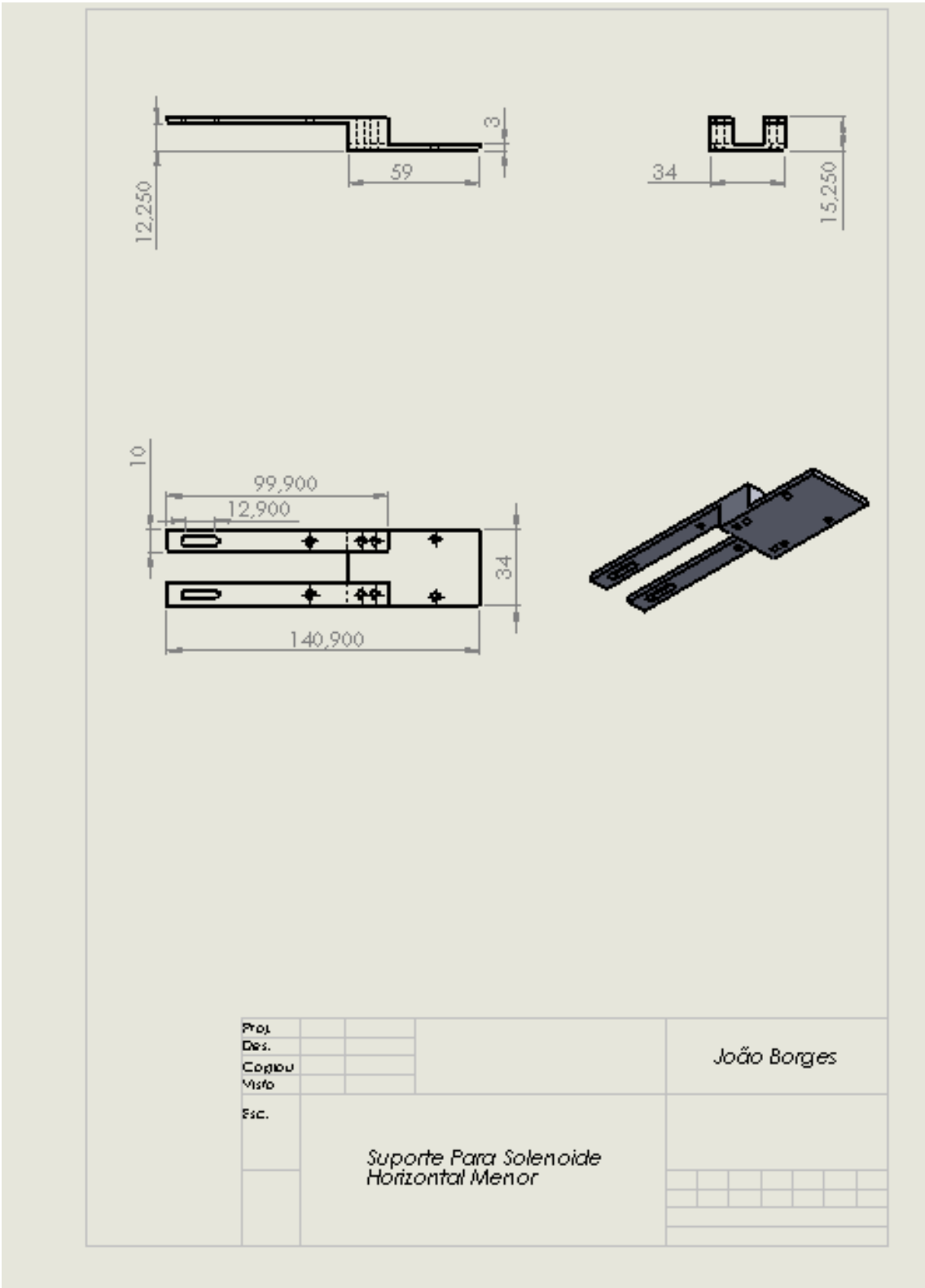
a)



c)



e)



f)

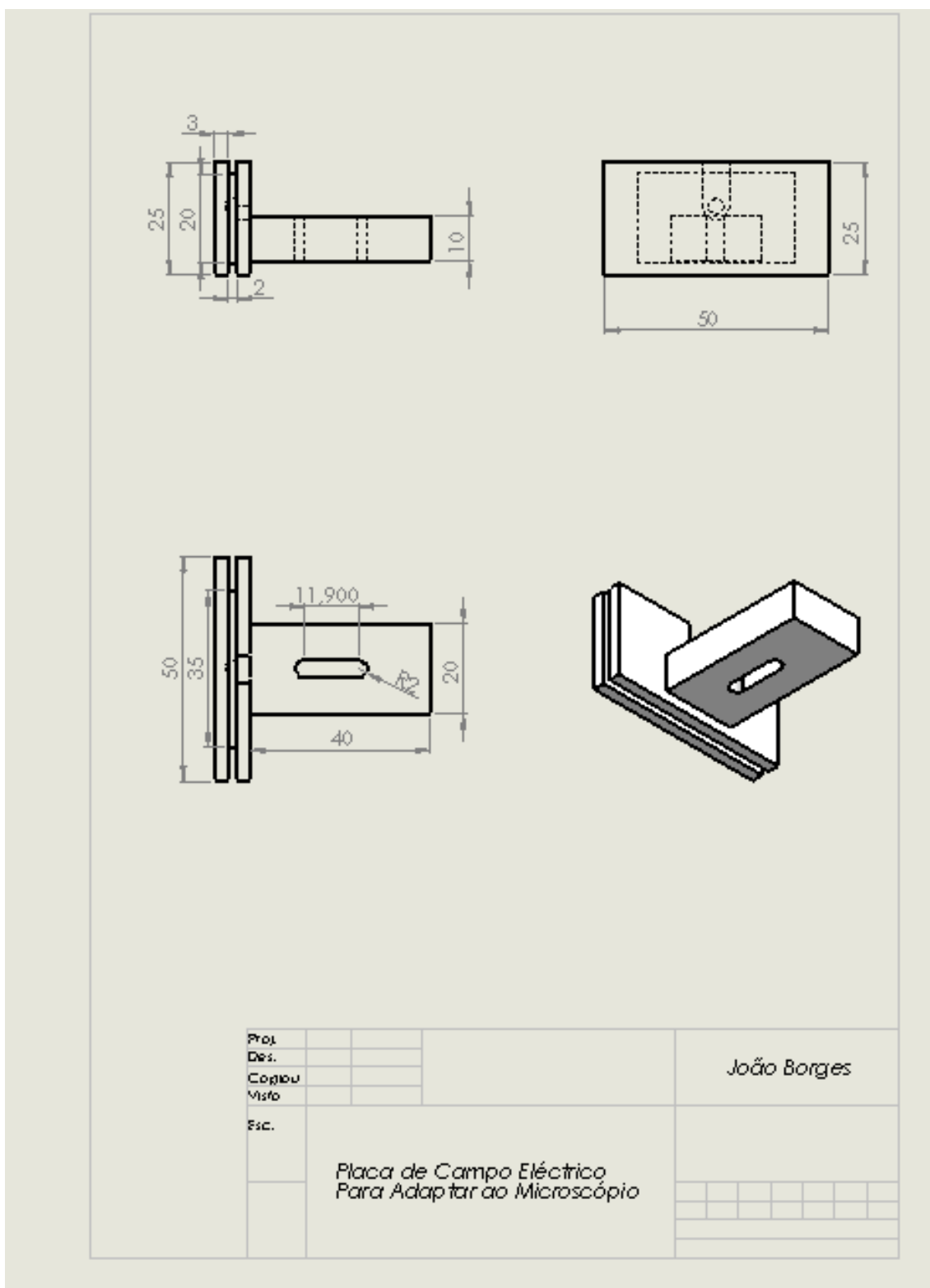


Figura A1: Principais componentes produzidos para adaptar à base do microscópio a) base a adaptar ao microscópio, b) cursor para o solenoide gerador de campos magnéticos verticais, c) base para o solenoide gerador de campos magnéticos verticais, d) suporte para o solenoide horizontal maior, e) suporte para o solenoide horizontal menor, f) placa de campo eléctrico para adaptar ao microscópio

A2 - Folhas de desenho em SolidWorks para os principais componentes do sistema de placas de campo eléctrico capazes de gerar um campo mais homogéneo

e)

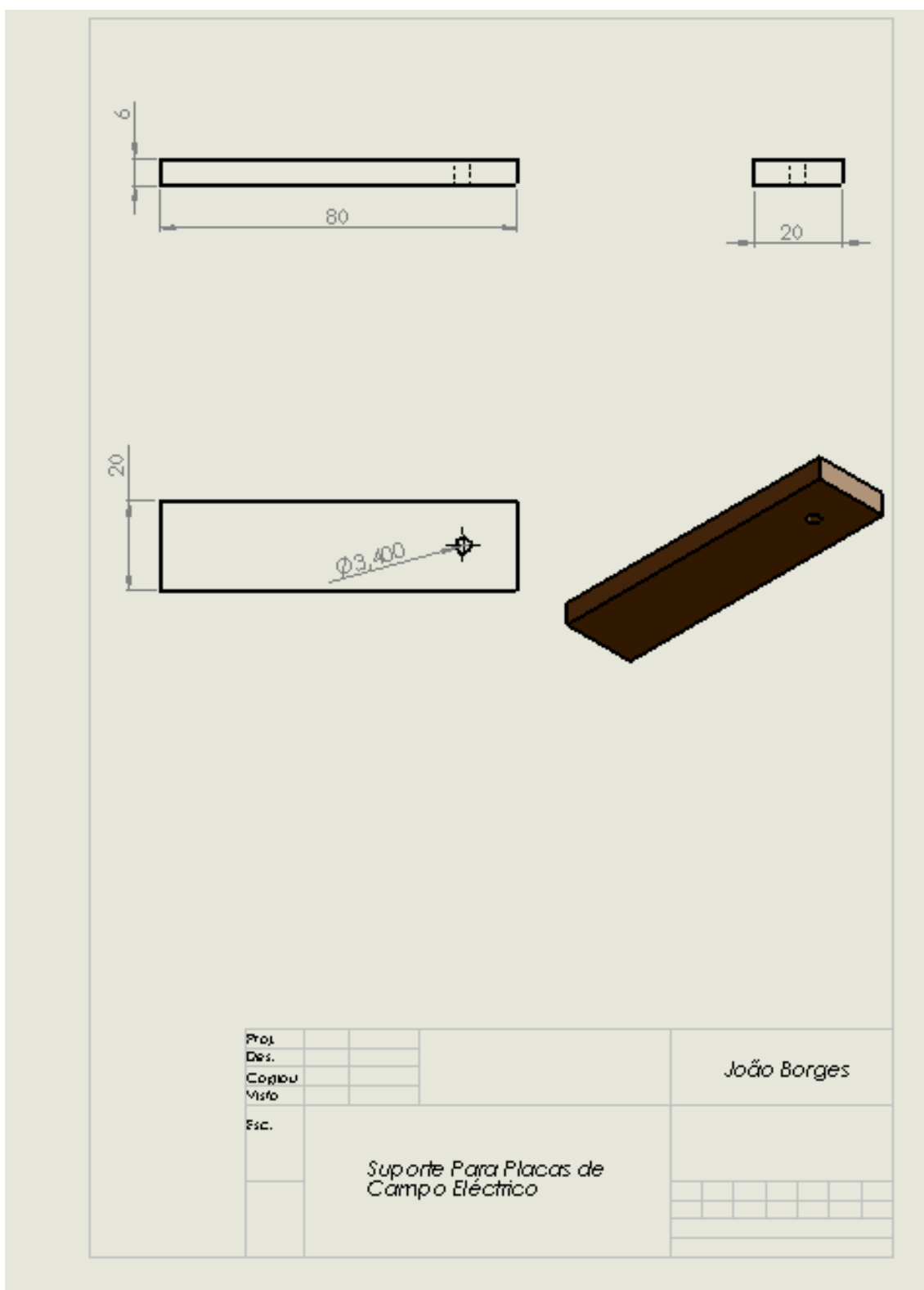
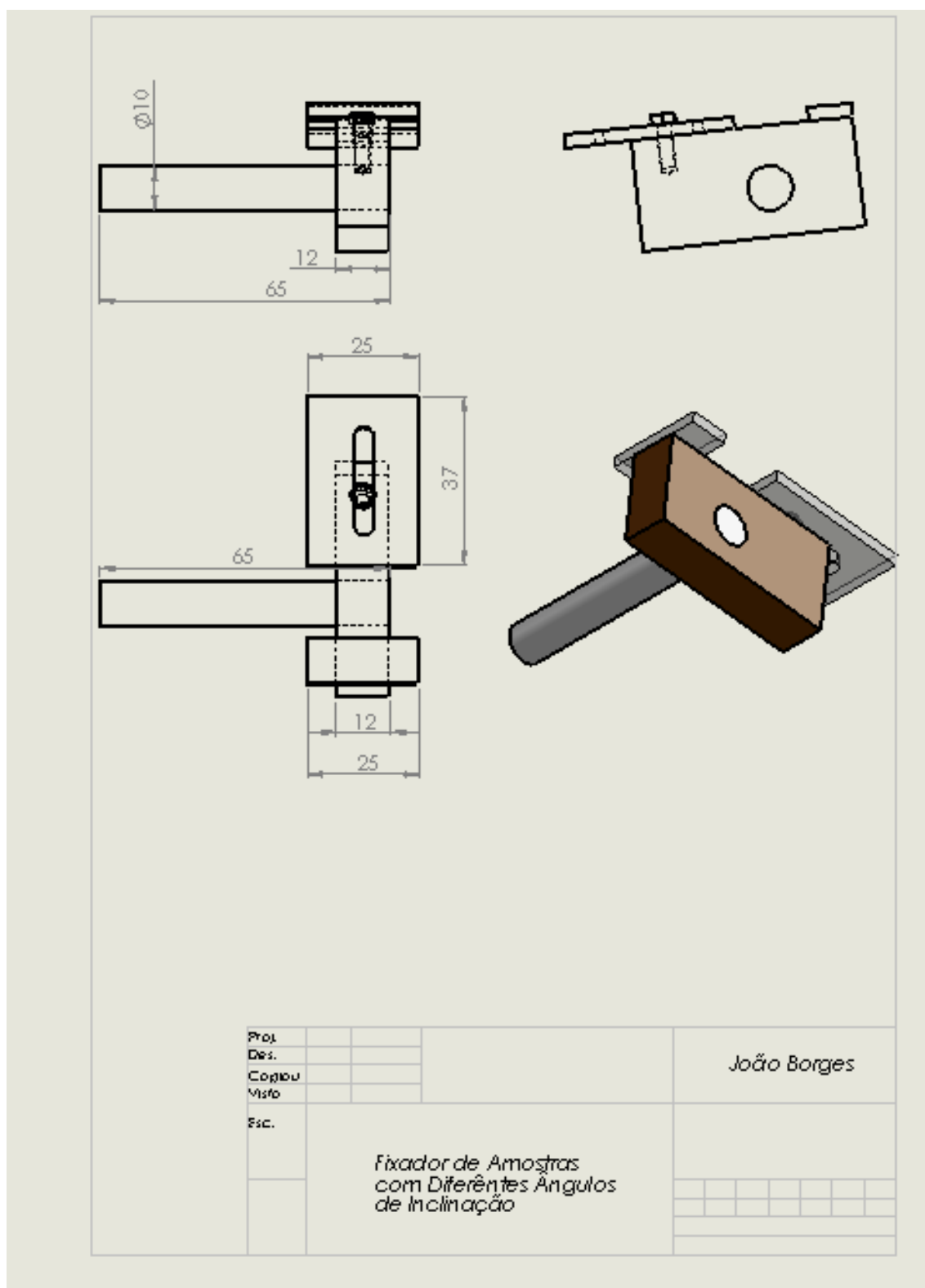


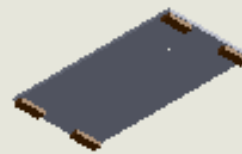
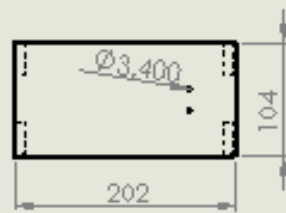
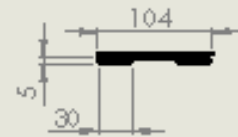
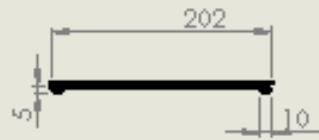
Figura A2 - Principais componentes produzidos para o sistema de placas eléctricas capazes de gerar um campo eléctrico mais homogéneo: a) placa para um campo eléctrico mais homogéneo, b) perfil bosh 1 e 2, c) perfil bosh sobre o qual se faz a rotação do dispositivo, d) base para acentar as amostras, e) suporte para as placas de campo eléctrico

A3 - Folhas de desenho em SolidWorks para os componentes do sistema produzido para a remoção do excesso de suspensão bacteriana à superfície

a)

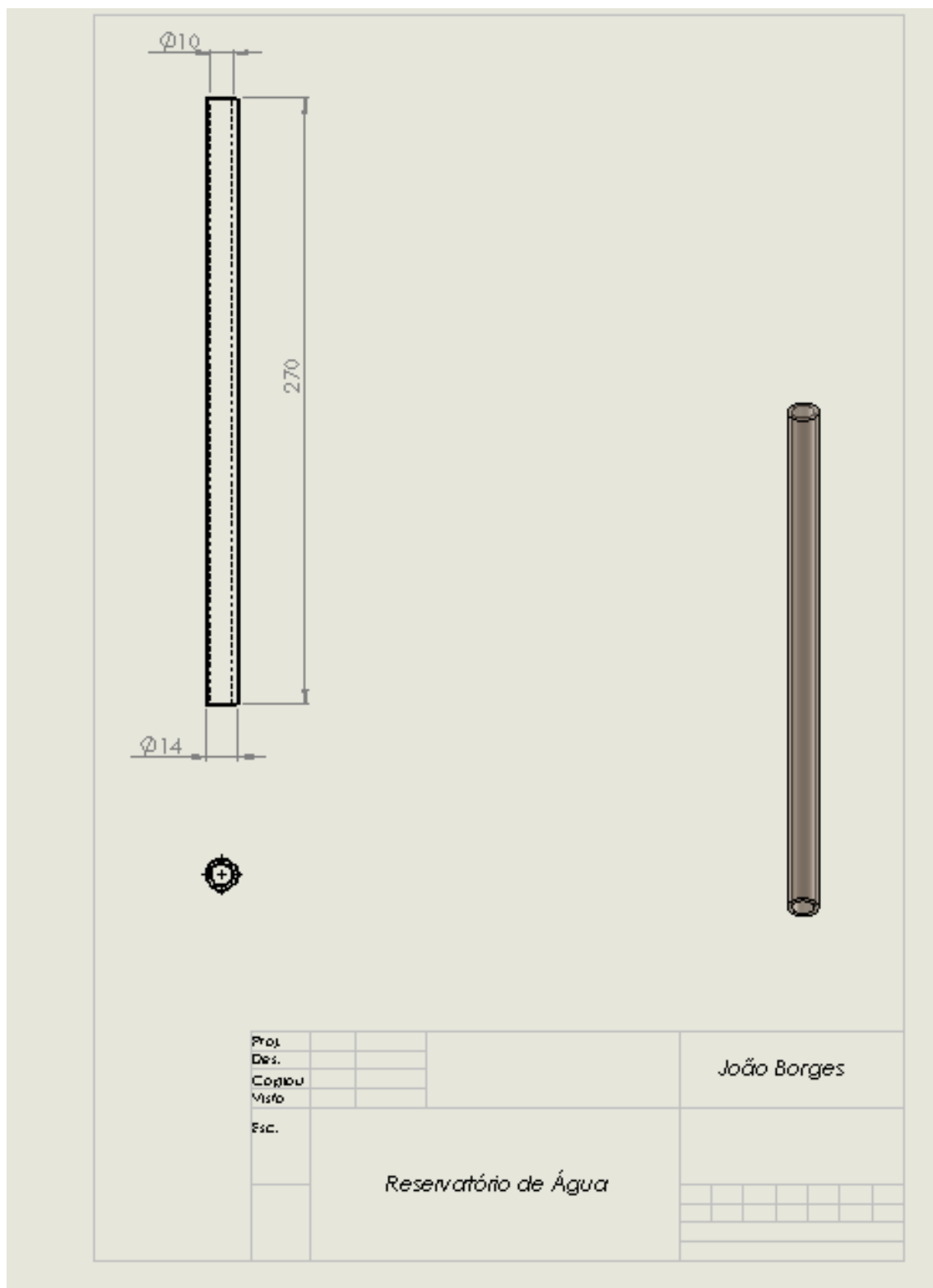


b)

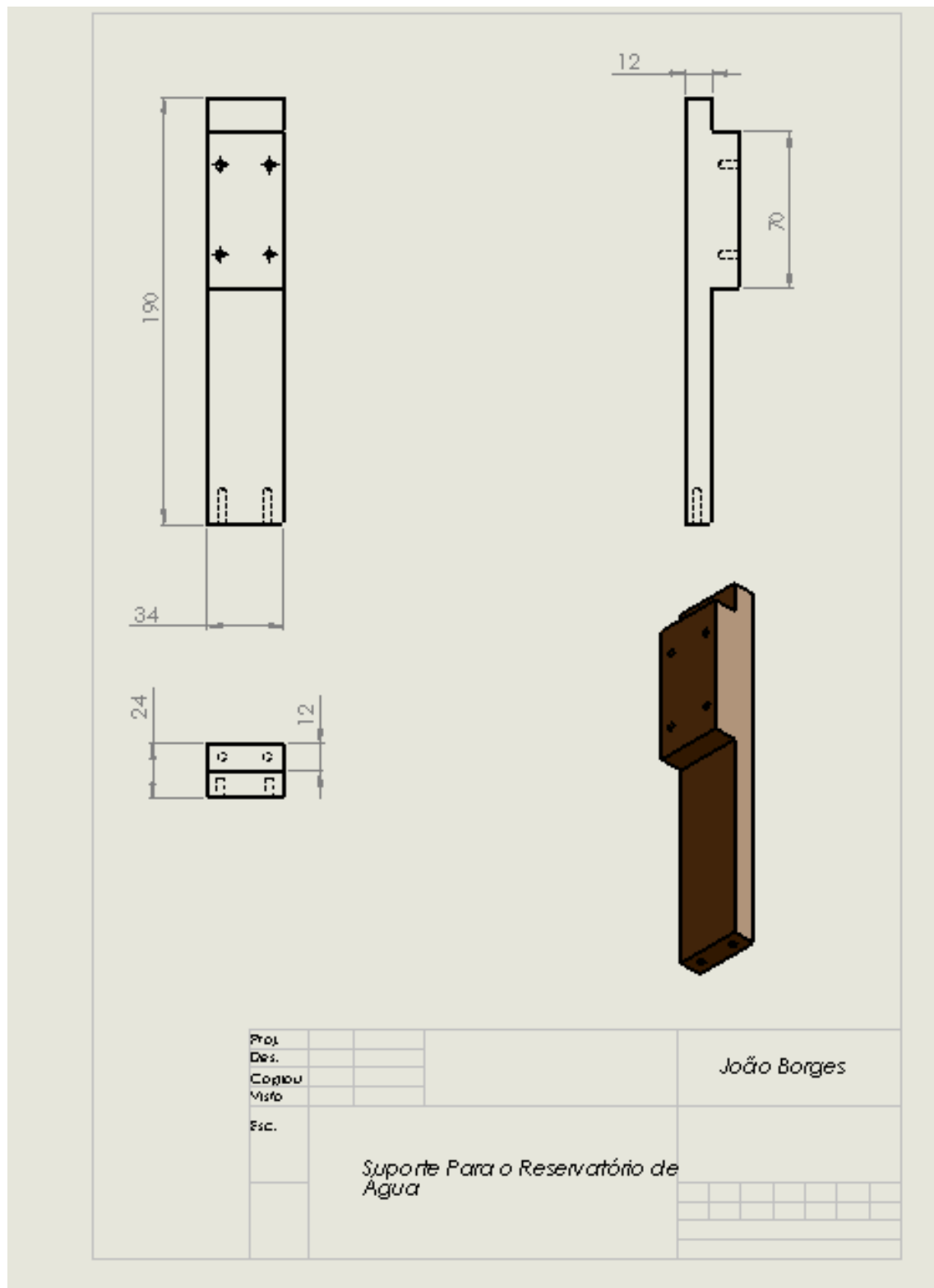


Proj.				João Borges
Des.				
Copiou				
Visto				
Esc.	Base do Sistema de Lavagem			

c)



d)



e)

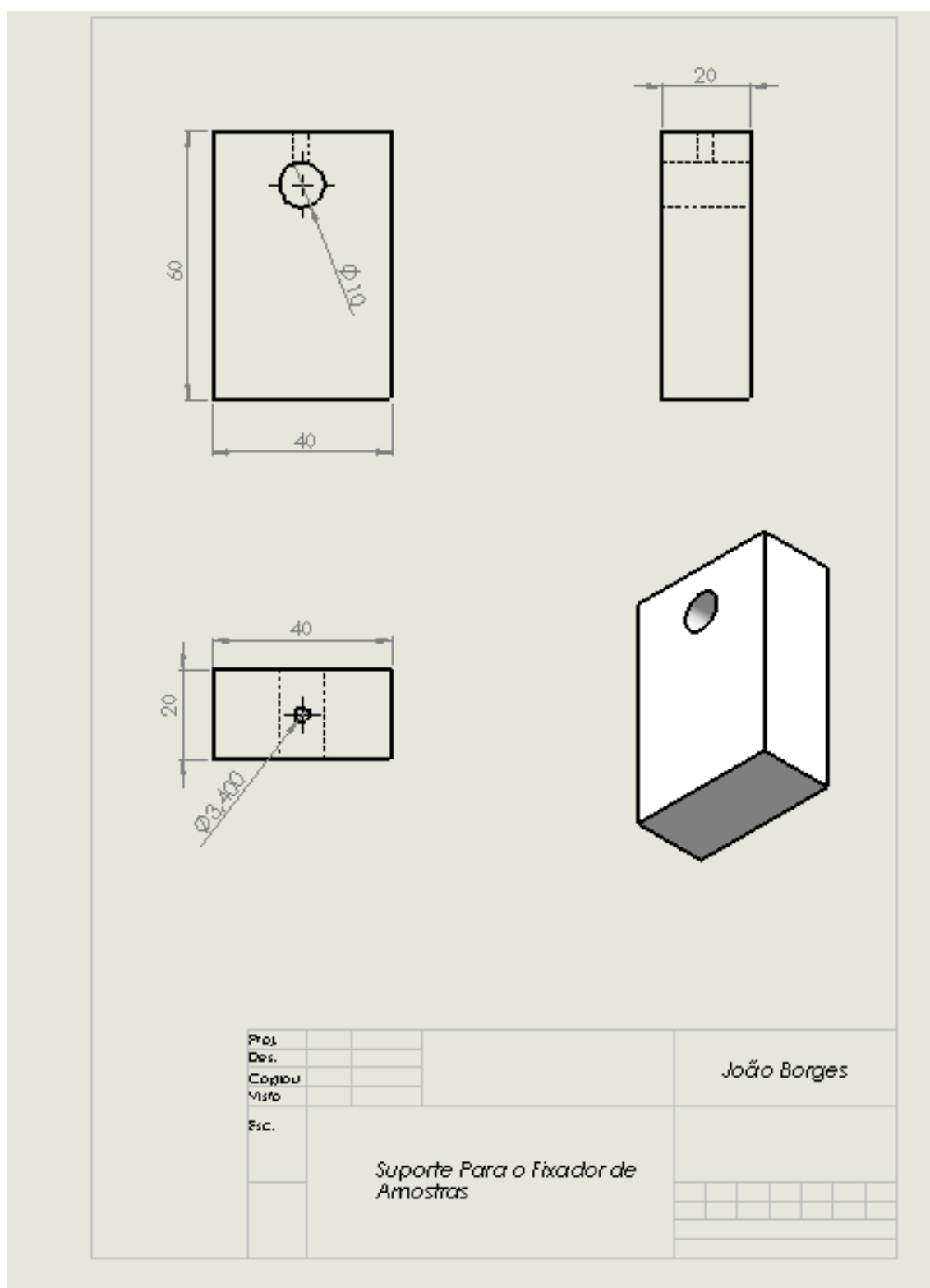
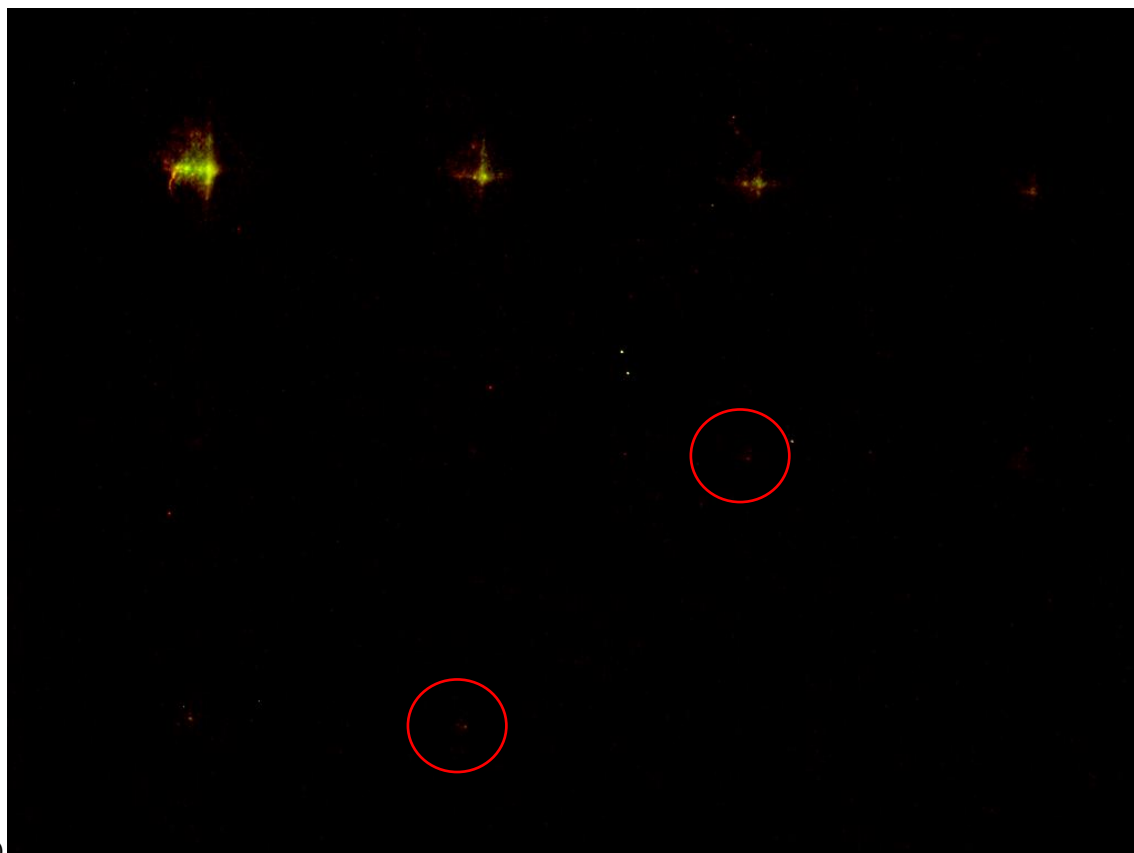


Figura A3 - Principais componentes produzidos para o sistema de remoção de excesso das amostras: a) fixador de amostras com diferentes ângulos de inclinação, b) base do sistema de lavagem, c) reservatório de água, d) suporte para o reservatório de água, e) suporte para o fixador de amostras

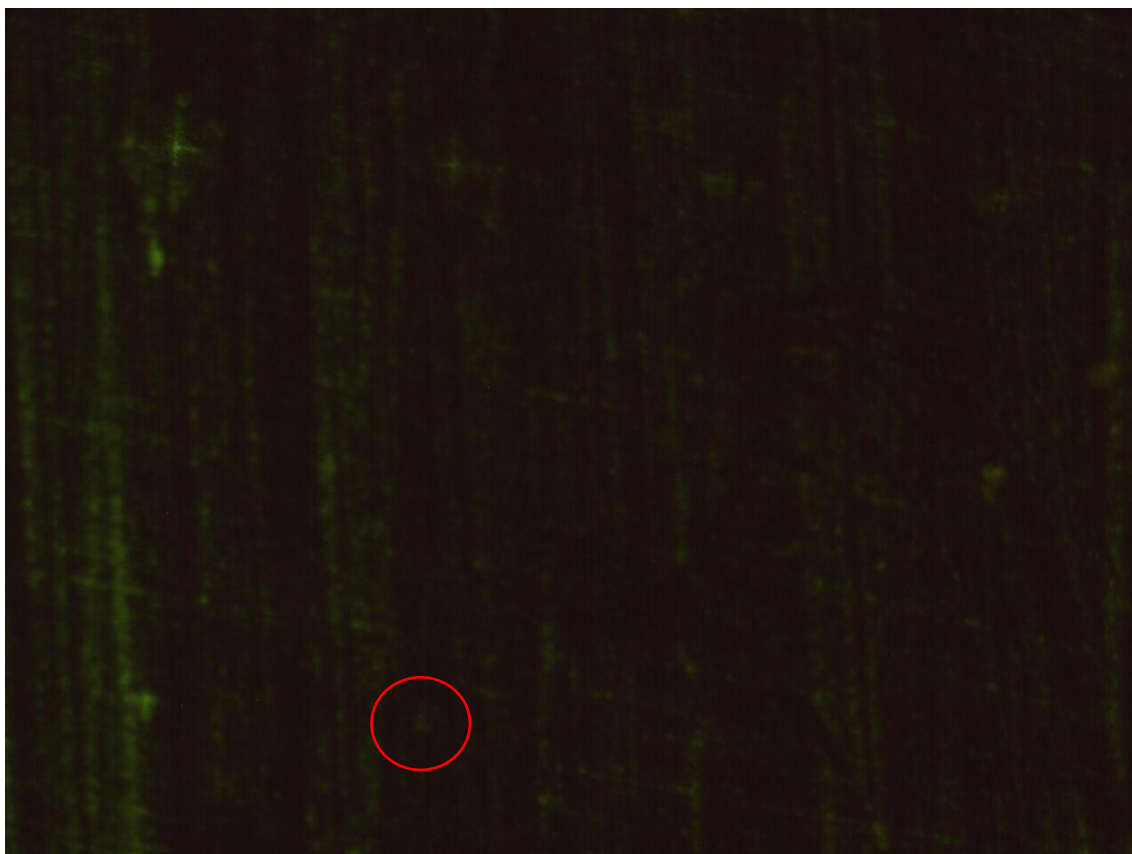
A4 – Imagens em tamanho grande para sobressair os defeitos que não eram visíveis na imagem pequena



a)



b)

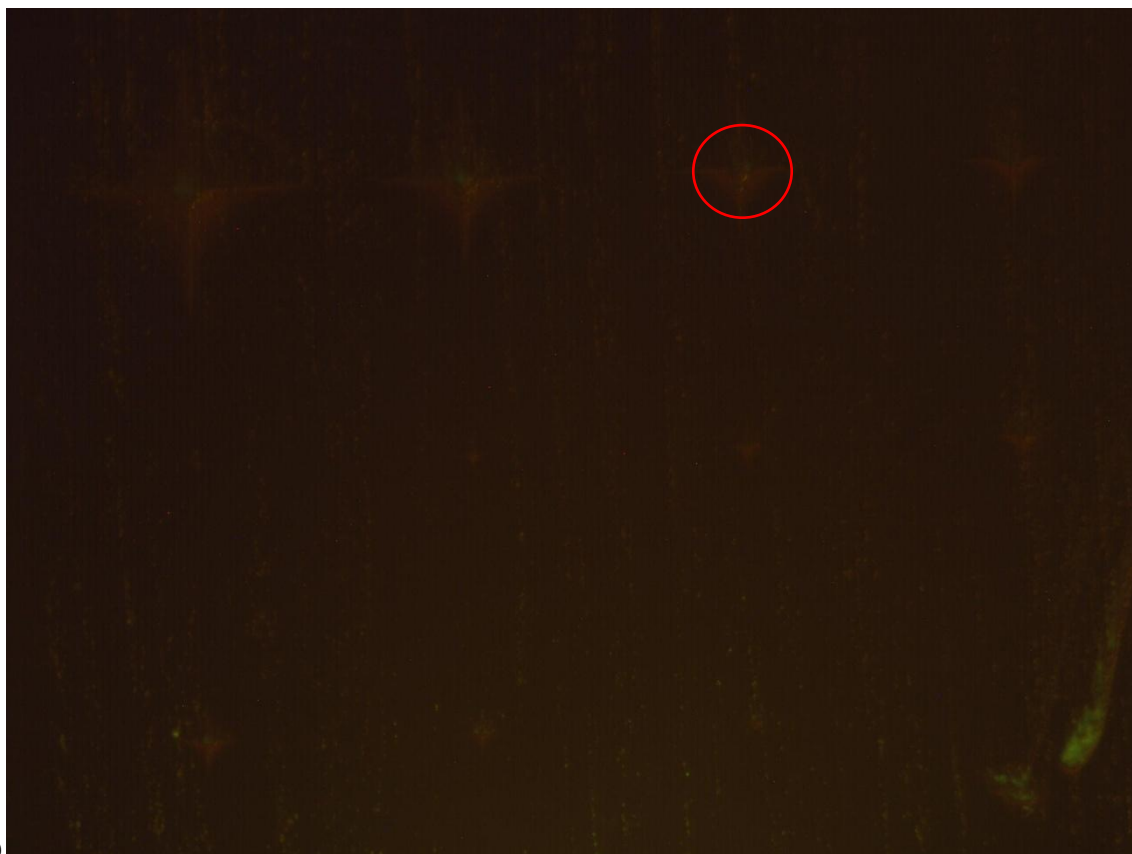


c)



d)





g)
 Figura A 4 – Imagem ao microscópio de penetração e aderência de: a) 1 minuto para a amostra de cobre e para suspensão de bactérias positivas, b) 1 minuto para a amostra de alumínio e para a suspensão de bactérias positivas, c) 2 minutos para a amostra de alumínio e para a suspensão de bactérias positivas, d) 1 minuto para a amostra de aço e para a suspensão de bactérias positivas, e) 2 minutos para a amostra de aço e para a suspensão de bactérias positivas, f) 4 minutos para a amostra de PMMA e para a suspensão de bactérias positivas, g) 5 minutos para a amostra de PMMA e para a suspensão de bactérias positivas